

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 018**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2009 E 09712816 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2247749**

54 Título: **Quinasa termoestable unida covalentemente para la validación de un proceso de descontaminación**

30 Prioridad:

20.02.2008 GB 0803068

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.03.2013

73 Titular/es:

**HEALTH PROTECTION AGENCY (100.0%)
Porton Down Salisbury
Wiltshire SP4 0JG, GB**

72 Inventor/es:

**SUTTON, J., MARK;
HESP, J., RICHARD y
UNGURS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 018 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Quinasa termoestable unida covalentemente para la validación de un proceso de descontaminación.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere al campo de indicadores biológicos, y en particular a indicadores biológicos para la validación de procesos de tratamiento diseñados para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra. La presente invención se refiere además a métodos de preparación de estos indicadores y a los usos de los mismos.
- 10 **[0002]** Se conocen una amplia variedad de indicadores biológicos para validar procesos de limpieza y descontaminación. Éstos varían desde indicadores relativamente básicos, tales como los que utilizan una “valoración visual” simple para valorar si un proceso ha sido eficaz, hasta indicadores más sofisticados que dependen de quinazas termoestables como enzimas informadoras (WO2005/093085). Estos indicadores basados en quinazas han sido un desarrollo importante en el campo de indicadores biológicos, proporcionando un medio rápido y sensible
- 15 de validación de procesos.
- [0003]** El documento WO2005/093085 describe en detalle la producción y la utilización de los indicadores basados en quinazas referidos anteriormente. En resumen, se prepara un indicador habitual mediante la adsorción de una quinasa termoestable sobre un soporte sólido, tal como una tira indicadora o tira reactiva. A continuación, el
- 20 indicador se incluye con una muestra (que contiene un contaminante) a tratar, y el indicador más la muestra se someten a un proceso de tratamiento. A continuación, la reducción en la actividad de la quinasa indicadora por el tratamiento se correlaciona con la reducción en la cantidad o la actividad del contaminante. Cuando se determina un nivel de actividad que es conocido por correlacionarse con una reducción aceptable en el contaminante, a continuación el tratamiento se considera como validado.
- 25 **[0004]** Se ha encontrado que el rendimiento de estos indicadores basados en quinazas se puede mejorar significativamente mediante la reticulación covalente de la quinasa termoestable con un componente biológico, donde el componente biológico es un mimético/sustituto del contaminante. Esto permite que el indicador refleje de manera más precisa la reacción del contaminante al proceso de tratamiento, que, a su vez, conduce a
- 30 precisión/sensibilidad mejorada del indicador y, de este modo, menos “falsas” validaciones de procesos.
- [0005]** De manera ventajosa, el componente biológico puede ser parte de una matriz o mezcla biológica, tal como muestra contaminada de análisis disponible comercialmente (suelo de Browne, suelo de Edimburgo, etc.), sangre, tejido neurológico, alimentos, material de animal sacrificado, suero, óvulos, moco, o una muestra contaminada de
- 35 análisis producida para cumplir con los requisitos específicos del usuario. De este modo, la reducción en la cantidad/actividad de la quinasa es función de las diversas propiedades de la matriz, lo cual mejora adicionalmente la precisión/sensibilidad del indicador.
- [0006]** Un indicador de este tipo también es capaz de monitorizar la eliminación/desactivación de un componente
- 40 específico de la matriz o mezcla. De manera ventajosa, se puede diseñar un indicador de manera que la quinasa termoestable esté unida al componente de la matriz más “difícil” de eliminar/desactivar (por ejemplo, en una matriz de sangre, la fibrina es mucho más difícil de eliminar que la hemoglobina). Esto proporciona una validación extremadamente rigurosa del proceso de tratamiento.
- 45 **[0007]** Los indicadores descritos anteriormente también presentan la ventaja de proporcionar validaciones de procesos rápidas de una etapa. Esto contrasta con ciertos indicadores de validación conocidos que requieren múltiples etapas para la validación y, por tanto, requieren una mayor inversión de tiempo y esfuerzo. A modo de ejemplo, el documento WO00/65344 describe la utilización de un prión de levadura como indicador biológico para un proceso de descontaminación de priones. Al final del proceso, en una etapa adicional, el operador debe analizar la
- 50 destrucción del prión de levadura a efectos de validar el proceso, En cambio, los indicadores descritos anteriormente se diseñan para tener una quinasa indicadora unida directamente a un componente biológico que mimetiza el contaminante relevante (por ejemplo, prión), de manea que la destrucción de este componente está íntimamente unido a la pérdida de actividad quinasa. Por tanto, estos indicadores son capaces de proporcionar una indicación rápida en una única etapa de la eficacia de proceso.
- 55 **[0008]** Por lo tanto, la presente invención se refiere al problema de proporcionar un indicador biológico de base quinasa alternativo/mejorado.

Indicador de procesos biológicos

60

[0009] En un primer aspecto de la invención, se proporciona un indicador de proceso biológico para validar un proceso de tratamiento en el que se reduce la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, en el que el indicador comprende una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico, con la condición de que el componente biológico no sea un anticuerpo.

5

[0010] En una realización, el componente biológico es un mimético o sustituto del contaminante y, por tanto, reacciona al proceso de tratamiento sustancialmente de la misma manera que el contaminante. En otra realización, el componente biológico puede ser el mismo, pero físicamente diferente, que el contaminante en la muestra que se va someter al proceso de tratamiento, por ejemplo, si el contaminante es una proteína, entonces el componente biológico es también una proteína; si el contaminante es una proteína de la sangre, el componente biológico es también una proteína de la sangre; si el contaminante es una molécula de ADN, entonces el componente biológico es también una molécula de ADN; si el contaminante es una molécula de ARN, entonces el componente biológico es también una molécula de ARN, etc, para cada uno de los contaminantes y componentes biológicos descritos en esta memoria. En una realización adicional, el componente biológico puede ser diferente del contaminante.

15

[0011] Entre los componentes biológicos que se pueden utilizar en los indicadores de la invención se incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos.

[0012] En una realización, el componente biológico comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la sangre, una proteína bacteriana, una proteína viral, una proteína fúngica, y una proteína autoagregante y una proteína formadora de amiloides.

20

[0013] En una realización adicional, la proteína de la sangre se selecciona del grupo que consiste en proteínas de la coagulación de la sangre (por ejemplo, fibrinógeno, péptidos de fibrina, fibrina, sustratos de transglutaminasa, trombina), proteínas de suero (por ejemplo, albúmina y globulina), proteínas de plaquetas, glicoproteínas de células sanguíneas y hemoglobina.

25

[0014] En otra realización, la proteína bacteriana se selecciona del grupo que consiste en una proteína fimbrial bacteriana (por ejemplo, CgsA de *E.coli* y AgfA de *Salmonella*), una proteína de toxina bacteriana (por ejemplo, toxinas de *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*), una proteína de la superficie celular bacteriana (por ejemplo, peptidoglicano, lipoproteínas), y una proteína de espora bacteriana (por ejemplo, de bacterias Gram positivas y que tienen una secuencia similar o estructura global con las proteínas que forman los apéndices de los lazos en *Clostridium taeniosporum*, proteínas chaplina, proteínas rodliina).

30

[0015] En otra realización, la proteína viral se selecciona del grupo que consiste en una proteína de la cubierta viral, una proteína de la cápside viral y una proteína del núcleo viral. De manera adecuada, las proteínas virales son de un virus bacteriófago (por ejemplo, las proteínas MS2 y PP7), virus norwalk (por ejemplo, proteína de la cápside), rotavirus (por ejemplo, proteínas VP2, VP6 y VP7), coronavirus (por ejemplo, proteínas SARS S, E y M), virus de la lengua azul (por ejemplo, proteína VP2), virus del papiloma humano (por ejemplo, proteína estructural principal viral, L1), hepatitis B (por ejemplo, proteína de la cubierta pequeña HBsAg), virus de la Hepatitis C (por ejemplo, proteínas del núcleo E1 y E2), virus de la gripe (por ejemplo, proteínas de neuraminidasa y hemaglutinina y de matriz), virus de la polio (por ejemplo, proteínas de la cápside VP0, 1 y 3), VIH (por ejemplo, proteína de la cubierta Pr55gag) y virus del dengue B (por ejemplo, cubierta (e) y pre-membrana/ membrana (prM/M)).

40

[0016] En otra realización, la proteína fúngica se selecciona del grupo que consiste en proteínas de hidrofobinas (por ejemplo, SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*, y proteínas equivalentes de levadura), proteínas de espora fúngica, proteínas hifales, micotoxinas, y priones fúngicos (por ejemplo Sup35, Het S, URE 2, Rnq1, New 1).

45

[0017] En otra realización, la proteína autoagregante se selecciona del grupo que consiste en priones (por ejemplo, PrPSc y PrPc, Sup35, Het S, Ure 2, Rnq1, New 1), proteínas miméticas de priones, fibrilas amiloides, adhesinas de la superficie celular de bacterias formadoras de flóculos y filamentosas en lodo activado, proteína beta amiloide, proteína tau, proteína de unión a poliadenina, glicoproteína B del virus del herpes simplex, proteína C de surfactante de pulmón, proteína CsgA de *E.coli*, proteína AgfA de especies de *Salmonella*, proteínas fimbriales bacterianas, apolipoproteínas (por ejemplo, apolipoproteína A1), hidrofobinas de especies fúngicas (por ejemplo, SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*), chaplinas (por ejemplo, Chps A-H de *Streptomyces spp*), rodlinas (por ejemplo, Rd1A y Rd1B de *streptomyces spp*), proteínas de cubierta de espora gram positivas (por ejemplo P29a, P29b, GP85 y un análogo de SpoVM), y proteínas de tipo cemento de percebe (por ejemplo, la proteína de 19kDa de *Balanus albicostatus*, y la proteína de 20kDa de *Megabalanus rosa*, y la nueva proteína de tipo cemento dependiente de calcita de *Balanus albicostatus*).

55

60

[0018] En otra realización, el ácido nucleico se selecciona de una molécula de ADN y una molécula de ARN. En una realización adicional, el ácido nucleico se selecciona entre ADN de cadena sencilla (ssDNA), ARN de cadena sencilla (ssRNA), ADN de doble cadena (dsDNA) o ARN de doble cadena (dsRNA). En una realización, el ácido nucleico deriva de tejido neurológico.

[0019] En otra realización, el carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en exopolisacárido, lipopolisacárido (EPS/LPS, a veces conocido como endotoxina) (por ejemplo de especies de *Legionella*, *E.coli*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Pseudomonas*, especies de *Acinetobactorte*, especies de *Campylobactor*, y especies de *Bacillus*), peptidoglicano, componentes de la pared celular de plantas, hongos y levadura (por ejemplo, quitina, lignina, glucano), preparaciones de mucina, glicolípidos (especialmente glicolípidos derivados de cerebro), glicoproteínas (por ejemplo, glicoproteínas de la superficie celular, Eap1 p), extractos de esporas (por ejemplo de *Bacillus spp*, *Clostridal spp* y otros formadores de esporas), polisacáridos de cápsulas de levadura, y secreciones de invertebrados (por ejemplo de geles de moluscos).

[0020] En otra realización, el lípido se selecciona del grupo que consiste en glicolípidos (por ejemplo, glicolípidos derivados del cerebro), gangliósidos (por ejemplo, gangliósidos de células neuronales, tales como GT_{1b}, GT_{1a} y gangliósidos de origen celular más general, tal como GM1), y aceites vegetales y lípidos.

[0021] En una realización adicional, el componente biológico es parte de una matriz biológica. En una realización, el indicador está unido covalentemente a la matriz biológica. La matriz biológica puede ser un mimético de la muestra que se trata. En una realización, la matriz biológica comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, o fragmentos o derivados de los mismos. En otra realización, la matriz biológica puede comprender una mezcla de proteínas. En una realización adicional, la matriz biológica puede comprender uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en sangre, suero, albúmina, moco, óvulo, tejido neurológico, alimentos, material de animal sacrificado y muestra contaminada de análisis disponible comercialmente. En otra realización de la invención, la matriz biológica comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en fibrinógeno, trombina, factor VIII, CaCl₂, y opcionalmente, albúmina y/o hemoglobina.

[0022] En una realización se la invención, la quinasa termoestable está unida covalentemente al componente biológico. En otra realización, la quinasa termoestable está reticulada genéticamente o químicamente al componente biológico. En una realización adicional, el componente biológico está unido a la quinasa termoestable en forma de una proteína de fusión.

[0023] Los indicadores de la invención se pueden utilizar para validar los procesos de tratamiento diseñados para eliminar/desactivar un contaminante seleccionado del grupo que consiste en una proteína, un lípido, un carbohidrato y un ácido nucleico.

[0024] El indicador de procesos biológicos de la invención puede comprender además un agente para estabilizar la quinasa, tal como iones metálicos, alcoholes de azúcar o agentes formadores de gel.

[0025] El indicador de la invención (incluyendo cualquier matriz biológica) también se puede "fijar" mediante tratamiento con etanol al 70% o isopropanol. Para conseguir esto, este indicador/matriz se incuba en isopropanol al 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto mimetiza uno de los procesos hallados habitualmente que pueden incrementar la resistencia de materiales contaminantes en instrumentos quirúrgicos y, por tanto, proporciona el indicador con un modo eficaz de monitorizar la eliminación de dichos materiales.

[0026] El indicador de procesos biológicos de la invención se puede inmovilizar en o sobre un soporte sólido. En una realización, el indicador de procesos biológicos se inmoviliza en el soporte sólido o se inmoviliza sobre el soporte sólido mediante reticulación o adsorción química. El indicador puede estar unido al soporte sólido a través de la quinasa termoestable o a través del componente biológico.

[0027] En una realización, el soporte sólido es una tira indicadora, una tira reactiva o una microesfera y, opcionalmente, comprende además medios para unir el soporte sólido a una superficie (tal como una proyección, hueco o apertura para la unión del soporte sólido a una superficie mediante un tornillo, tuerca y perno o abrazadera). En una realización adicional, el soporte sólido es una matriz y el indicador se dispersa en la matriz.

[0028] En una realización de la invención, la enzima utilizada para formar el indicador de procesos biológicos no es una liqenasasa, una xilanasasa, una xilosidasasa, una formiltransferasa, una Taq polimerasa, una alfa amilasa o una beta-

glucosidasa.

[0029] En otra realización de la invención, se proporciona una muestra contaminada de análisis que comprende un indicador tal como se describe anteriormente.

5

Preparación del indicador biológico

[0030] El indicador biológico de la invención se puede preparar mediante la unión covalente de una quinasa termoestable a un componente biológico apropiado. Se puede utilizar cualquier método adecuado de unión covalente conocido. En una realización, la quinasa termoestable se reticula genéticamente o químicamente al componente biológico y, en una realización, el indicador se prepara como una proteína de fusión.

[0031] La reticulación química se puede conseguir utilizando una gama de reactivos homobifuncionales y heterobifuncionales utilizados habitualmente para reticular proteínas para la generación de conjugados de enzimas u otros fines relacionados. Por ejemplo, en un indicador que comprende fibrina como componente biológico, la fibrina y la quinasa termoestable se puede derivar con la adición de SPDP (Perbio) a grupos amina primarios. La quinasa termoestable se puede reducir a continuación para generar un grupo tiol reactivo y, a continuación, éste se mezcla con la fibrina para producir uniones covalentes de fibrina-quinasa termoestable.

[0032] Las quinastas también se pueden reticular químicamente a carbohidratos, lípidos u otros glicoconjugados utilizando agentes heterobifuncionales siguiendo el tratamiento del carbohidrato diana con meta-peryodato. La reticulación se puede conseguir utilizando una variedad de químicas tal como se indica en el ejemplo 23.

[0033] Alternativamente, el indicador se puede preparar como una proteína de fusión. Esto se consigue mediante la fusión de un gen sintético que codifica una quinasa termoestable apropiada (por ejemplo, el gen que codifica AK de *Sulfolobus acidocaldarius* o *Thermatoga neopolitana*) a un gen que codifica un componente biológico apropiado. Los protocolos detallados para la preparación de los indicadores de proteínas de fusión se proporcionan en los ejemplos (véase, por ejemplo, los ejemplos 10 y 13).

Enzimas quinasa para utilizar en el indicador biológico

[0034] Las enzimas quinasa utilizadas en los indicadores de la invención son capaces de generar una señal que es detectable sobre un rango extremadamente amplio. En general, la quinasa se detecta utilizando un sustrato que comprende ADP que se convierte en ATP, utilizado para generar luz, por ejemplo, utilizando luciferina/luciferasa, detectada utilizando un luminómetro. El amplio rango hace que el indicador sea particularmente adecuado para la validación, ya que la quinasa permanece detectable incluso después de muchas reducciones logarítmicas en la cantidad/actividad. Para la esterilidad, la mayoría de institutos nacionales consideran necesaria una reducción 6 veces logarítmicas en la cantidad o la actividad de un contaminante antes de que la esterilidad pueda ser validada. Las quinastas utilizadas en los indicadores de la invención ofrecen el potencial de reducir la validación en la cantidad o actividad de contaminantes más allá de 6 veces logarítmicas a 8 veces logarítmicas y más.

[0035] Se puede utilizar cualquier enzima quinasa adecuada como quinasa informadora en la presente invención. En una realización, la quinasa informadora es una adenilato quinasa, acetato quinasa o piruvato quinasa o una combinación de las mismas.

45

[0036] Las quinastas informadoras utilizadas en la invención pueden tener una variedad de estructuras terciarias reconocidas, por ejemplo, la quinasa pueden ser una quinasa trimérica o monomérica. Estas estructuras terciarias se pueden asociar con una mejor estabilidad de la quinasa en condiciones, tales como, por ejemplo, temperatura, pH, desnaturizantes químicos o proteasas.

50

[0037] En una realización, la quinasa informadora es una quinasa microbiana derivada de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Pyrococcus furiosus*, *P.abyssi*, *P.horikoshii*, *P.woesii*, *Sulfolobus solfataricus*, *S.acidocaldarius*, *S.shibatae*, *Rhodothermus marinus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermatoga maritima*, *Thermatoga neapolitana* y *Methanococcus spp.* En otra realización, la quinasa es una quinasa de *Sulfolobus sp.* o una quinasa de *Thermotoga sp.* En otra realización, la quinasa es una quinasa de *A. acidocaldarius*, quinasa de *A. fulgidus*, quinasa de *A. pernix*, quinasa de *A. pyrophilus*, quinasa de *B. caldotenax* BT1, quinasa de PS3 de especie *Bacillus*, quinasa de *B. stearothermophilus* 11057, quinasa de *B. stearothermophilus* 12001, quinasa de *B. thermocatenulatus*, quinasa de *C. stercorarium*, quinasa de *Methanococcus spp.*, quinasa de *M. ruber*, quinasa de *P. abyssi*, quinasa de *P. furiosus*, quinasa de *P. horikoshii*, quinasa de *P. woesii*, quinasa de *R. marinus*, quinasa de *S. acidocaldarius*, quinasa de *S. shibatae*, quinasa de *S. solfataricus*, quinasa de *T. ethanolicus*, quinasa de *T.*

60

thermosulfurogenes, quinasa de *T. celere*, quinasa de *T. litoralis*, quinasa de *T. aquaticus* YT1, quinasa de *T. caldophilus* GK24, quinasa de *T. thermophilus* HB8, quinasa de *T. maritima* o una quinasa de *T. neapolitana*. En una realización adicional, la quinasa es una quinasa de *T. litoralis*, quinasa de *T. maritima*, o una quinasa de *T. neapolitana*.

5

[0038] En una realización, la quinasa informadora es termoestable. Además de ser resistentes a temperaturas elevadas, también se halla que las quinastas termoestables son resistentes a otros procesos bioquímicos y físicos que normalmente dañan o destruyen proteínas o las hace desactivas, tales como la exposición a ciertos agentes químicos, por ejemplo, caótopos, daños por radicales libres, detergentes, extremos de pH, exposición a proteasas, reticulación de proteínas, encapsulación con membranas o polímeros no permeables o semipermeables, o inmovilización irreversible sobre superficies. (Véase, por ejemplo: Daniel RM, Cowan DA, Morgan HW, Curran MP, "A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis", *Biochem J.* 1982 207:641-4; Rees DC, Robertson AD, "Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins", *Protein Sci.* 2001 10:1187-94; Burdette DS, Tchernajenko V V, Zeikus JG. "Effect of thermal and chemical denaturants on *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary-alcohol dehydrogenase stability and activity", *Enzyme Microb Technol.* 2000 27:11-18; Scandurra R, Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L, Engel PC., "Protein thermostability in extremophiles", *Biochimie.* 1998 Nov;80(11):933-41; y Liao HH., "Thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase are also more stable to proteinase K, urea, detergents, and water-miscible organic solvents", *Enzyme Microb Technol.* 1993 Apr; 15(4):286-92, todos ellos incorporados en la presente por referencia en su totalidad).

20

[0039] Ejemplos de quinastas adecuadas para utilizar en la invención se indican en las SEQ ID NOs 1-32 siguientes. En una realización, las quinastas utilizadas en la invención tienen por lo menos un 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ó 100% de identidad con las SEQ ID Nos: 1-32.

25 **[0040]** Otros ejemplos de quinastas informadoras adecuadas se pueden encontrar en WO00/46357 y WO2005/093085, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[0041] En una realización de la invención, se detecta la actividad de quinasa utilizando un sistema de detección bioluminiscente de ATP. Un método de ensayo de luciferina-luciferasa estándar puede detectar como mínimo 10⁻¹⁵ moles de ATP. Mediante el acoplamiento de una amplificación enzimática a los métodos de detección bioluminiscentes es posible detectar como mínimo 10⁻²⁰ moles de quinasa.

30

Estabilización del indicador biológico

35 **[0042]** En la técnica son conocidos un conjunto de aditivos y cambios en la formulación que incrementan la estabilidad de una enzima, por ejemplo una quinasa, a la desactivación por calor.

[0043] La adición de agentes de estabilización, tales como sorbitol, hasta una concentración de 4 M, u otros polioles, tales como etilenglicol, glicerol o manitol, a una concentración de hasta 2 M puede mejorar la termoestabilidad de la enzima. Otros aditivos, tales como xilano, trehalosa, gelatina, también pueden proporcionar efectos de estabilización adicionales, ya sea individualmente o en combinación. La adición de una gama de iones metálicos divalentes, de manera más destacada Ca²⁺, Mg²⁺ o Mn²⁺ también puede mejorar la estabilidad de la enzima.

40

[0044] La modificación química de las enzimas también se puede utilizar para mejorar su estabilidad térmica. La alquilación reductora de los grupos amino expuestos en la superficie mediante ácido glioxílico (por ejemplo, Melik-Nubarov (1987) *Biotech letts* 9:725-730), la adición de carbohidratos a la superficie de proteínas (por ejemplo Klivanov (1979) *Anal. Biochem.* 93:1-25) y la amidación (por ejemplo, Klivanov (1983) *Adv. Appl. Microbiol.* 29:1-28) pueden incrementar la estabilidad de la enzima. Métodos adicionales que incluyen la utilización de agentes de reticulación químicos y la utilización de varios soportes poliméricos para la inmovilización de enzimas también son métodos relevantes para incrementar la termoestabilidad de enzimas (revisado en Gupta (1991) *Biotech. Appl. Biochem.* 14:1-11).

50

[0045] Modificaciones similares también son relevantes para la estabilización del indicador frente a otros procesos de esterilización, tales como peróxido de hidrógeno u ozono. En particular, los procesos en los que está limitado el acceso del esterilizador en fase gaseosa a la enzima, por ejemplo, mediante la encapsulación en un polímero o formulación adecuados con un aditivo para reducir la penetración del gas, proporcionarán métodos útiles para incrementar la estabilidad del enzima, si es necesario.

55

[0046] Muchos de los tratamientos que son eficaces en el incremento de la estabilidad térmica de enzimas también son relevantes en la estabilización contra tratamientos con proteasas, por ejemplo para el desarrollo de un indicador

60

para la desactivación eficaz de agentes TSE mediante un tratamiento con proteasas. En general, es probable que una proteína que muestra niveles elevados de termoestabilidad también muestre un grado elevado de estabilidad para procesos degradativos, tales como la desnaturalización o tratamiento con proteasas (Véase, por ejemplo: Daniel RM, Cowan DA, Morgan HW, Curran MP, "A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis", *Biochem J.* 1982 207:641-4; Rees DC, Robertson AD, "Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins", *Protein Sci.* 2001 10:1187-94; Burdette DS, Tchernajenko V V, Zeikus JG. "Effect of thermal and Chemicals denaturants on *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary-alcohol dehydrogenase stability and activity", *Enzyme Microb Technol.* 2000 27:11-18; Scandurra R, Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L, Engel PC., "Protein thermostability in extremophiles", *Biochimie.* 1998 Nov;80(11):933-41; y Liao HH., "Thermostable mutants of kanamycin nucleotidyltransferase are also more stable to proteinase K, urea, detergents, and water-miscible organic solvents", *Enzyme Microb Technol.* 1993 Apr;15(4):286-92). Por lo tanto, las quinisas termoestables muestran en general un grado más elevado de estabilidad a las acciones de los tratamientos con proteasas diseñados para desactivar los agentes TSE que lo que podrían quinisas mesofílicas equivalentes. Dependiendo del tipo de proceso utilizado, también se puede seleccionar una quinisa para favorecer otras características del proceso. De este modo, para un tratamiento con proteasas a pH alcalino, el protocolo tiende a la utilización de una quinisa termoestable de un organismo moderadamente alcalofílico, tal como *P.furiosus*, mientras que un tratamiento con proteasas a pH ácido podría utilizar una quinisa de un acidófilo, tal como *S.acidocaldarius* o *S.solfataricus*.

[0047] Si se requiere para mejorar la estabilidad del indicador de quinisa en el tratamiento con proteasas existen un conjunto de otras opciones. Un conjunto de éstas son las mismas que las descritas anteriormente para la estabilización de la enzima contra el tratamiento térmico. Por ejemplo, las formulaciones que contienen sorbitol, manitol u otros polímeros complejos reducen los niveles de desactivación de la enzima en la superficie del indicador. Además, los tratamientos que reducen específicamente la velocidad en que un sustrato de proteasa se degrada son particularmente relevantes para esta aplicación. Por ejemplo, la formulación de la quinisa en una solución que contiene hasta alrededor de 10 mg/ml (un exceso de 10 veces en comparación con la concentración preferida del indicador) de una proteína portadora adecuada, tal como caseína o albúmina, que actúa como sustrato alternativo para la proteasa, reducirá específicamente la velocidad de digestión del indicador de quinisa. De manera similar, la adición de aminoácidos libres, tales como glicina, tirosina, triptófano o dipéptidos a la formulación proporcionaría un medio de inhibición del nivel de sustrato de la enzima y reduciría la desactivación local del indicador de quinisa.

[0048] Las quinisas termoestables producidas mediante la expresión recombinante en bacterias también se pueden utilizar en la presente invención. Se ha observado que la modificación genética de enzimas proporciona aumentos significativos en la estabilidad térmica y por analogía dichas mutaciones también aumentarán probablemente de manera significativa la estabilidad de las enzimas indicadoras en otros procesos, tales como el tratamiento con proteasas o la "esterilización" en fase gaseosa. La comparación de la termoestabilidad de las enzimas quinisas obtenida con la estructura tridimensional definida de las AK (arqueas) triméricas (Vonnrhein et al (1998) *J. Mol. Biol.* 282:167-179 y Criswell et al (2003) *J. Mol. Biol.*330:1087-1099) ha identificado aminoácidos que influyen en la estabilidad de la enzima.

[0049] Las variantes de quinisas modificadas genéticamente que muestran una termoestabilidad mejorada también se utilizan en la presente invención y se pueden generar de varias maneras. Esencialmente éstas implican la mutagénesis dirigida de sitio específico de aminoácidos que se cree que forman parte de la región de empaquetamiento del núcleo central de la molécula trimérica y métodos de "evolución dirigida" aleatoria donde la molécula completa se somete a rondas posteriores de mutagénesis y la selección/cribado de moléculas con propiedades mejoradas. Las enzimas modificadas específicas se establecen en las SEQ ID NOs: 17-19 (varias variantes están comprendidas por cada referencia). Estas modificaciones descritas se basan en una estrategia de híbridos que utiliza una estrategia basada en consenso para definir regiones que probablemente influyen en la termoestabilidad de las enzimas en base a las diferencias observadas entre moléculas estructuralmente relacionadas. Esto va seguido de cambios definidos para incorporar los aminoácidos que se correlacionan con la mejor estabilidad o una sustitución aleatoria para incorporar cada aminoácido disponible en las posiciones definidas como esenciales para la termoestabilidad.

[0050] La estabilidad/resistencia de los indicadores que se unen a componentes biológicos que son parte de una matriz se puede mejorar mediante el incremento de la concentración del componente biológico en la matriz, o mediante el incremento del grado de reticulación. A modo de ejemplo, uno de los indicadores de la invención emplea un indicador de péptido quinisa reactiva a fibrina para realizar una reticulación en una matriz biológica que contiene fibrina, por ejemplo, una película de fibrina. Mediante la alteración de la película de fibrina, por ejemplo, mediante el incremento de la concentración de fibrina, o mediante el incremento de su grado de reticulación, es posible incrementar de manera significativa la resistencia del indicador a procesos específicos.

60

[0051] La resistencia de indicadores que contienen componentes biológicos, tales como Sup35, se puede incrementar mediante la inducción de la fibrilación de los indicadores. Esto proporciona una molécula con una mayor estabilidad física y puede ser relevante para monitorizar la desactivación de agentes, tales como proteínas priones, que se cree que son de naturaleza multimérica.

5

[0052] En una realización, el indicador se formula en un portador seleccionado del grupo que consiste en sacarosa (por ejemplo hasta un 15 p/v), mucina (por ejemplo, hasta un 0,5% p/v), y albúmina (por ejemplo, hasta 1 mg/ml).

Soportes sólidos

10

[0053] El indicador biológico de la invención puede estar unido a un conjunto de soportes sólidos. Los soportes pueden ser con o sin modificaciones químicas y pueden comprender uno o más indicadores en un conjunto de formulaciones, dependiendo, por ejemplo, de las necesidades del proceso a validar. En una forma, el soporte es una superficie de plástico, madera, cerámica, vidrio, tela, acero u otra superficie metálica o polimérica sobre la que se seca/reticula el indicador como medio de inmovilización. El soporte puede ser una tira indicadora o reactiva de policarbonato, poliestireno o polipropileno, opcionalmente con una superficie aplanada, sobre la que se aplica el indicador. Un tipo adicional de soporte con una superficie porosa para la unión del indicador es también particularmente útil como indicador para procesos gaseosos. Las microesferas de plástico, madera, metálicas o cerámicas también pueden proporcionar un formato valioso para el soporte sólido, de nuevo con relevancia específica para monitorizar los procesos gaseosos. Dichos soportes presentan ventajas para ciertas aplicaciones, ya que proporciona un área superficial significativamente incrementada para la unión del indicador. En una realización adicional, el soporte sólido es una matriz y el indicador se dispersa en la matriz. En otra realización, la matriz es una matriz biológica compleja.

25 Inmovilización del indicador biológico sobre el soporte sólido

[0054] Los indicadores de la invención se pueden unir sobre el soporte sólido mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica.

30 **[0055]** En una realización de la invención, el indicador se une sobre el soporte sólido a través de métodos estándar de adsorción de proteínas descritos a continuación.

[0056] La unión del indicador sobre el soporte sólido se puede conseguir mediante métodos utilizados habitualmente para unir proteína a las superficies, por ejemplo, la incubación de proteína en tampón de bicarbonato de sodio 0,1 M a pH de aproximadamente 9,6 a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Alternativamente, la proteína se une covalentemente a la superficie utilizando una amplia gama de químicas de acoplamiento conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, se une covalentemente una proteína de fusión de adenilato quinasa (por ejemplo a Sup35) derivada con SPDP (Pierce chemicals; utilizando las instrucciones del fabricante), reducida con DTT para proporcionar grupos sulfhidrilo libres para la reticulación, a un soporte de poliestireno con una superficie de maleimida. Las superficies de plástico con dichas superficies de unión a sulfhidrilo están descritas en la literatura. Una ventaja añadida de este método de acoplamiento es que, si es necesario, la enzima se puede separar del soporte, por ejemplo, mediante reducción con DTT o MESNA, para permitir que se lleve a cabo el ensayo por separado a cualquier soporte de indicador. Los indicadores descritos en esta solicitud tienen la propiedad de que su actividad se mantiene tras la derivación y la reticulación a dichos soportes.

45

[0057] Alternativamente, se utiliza una superficie reactiva a amina en un soporte de poliestireno o policarbonato, con un agente de reticulación bifuncional, tal como glutaraldehído monomérico, para proporcionar una reticulación no separable directa del indicador de quinasa a través de grupos amina libres en la proteína. El tratamiento con UV también se puede utilizar para unir directamente el indicador a un soporte adecuado. Las superficies de acero se pueden tratar de forma similar a las superficies de plástico para mediar la unión covalente del indicador.

50

[0058] Están disponibles una amplia variedad de reactivos reticulantes en compañías, tales como Pierce chemical company (Perbio). Se diseñan reactivos que son reactivos a grupos sulfhidrilo, amino, hidroxilo y carboxilo para acoplar proteínas, pero se pueden utilizar igualmente para reticular proteínas a soportes reactivos de forma natural o soportes sólidos recubiertos, tales como plásticos, otros polímeros, vidrio y metales. Las químicas reactivas también están disponibles para reticular las enzimas a carbohidratos. Por ejemplo, se pueden utilizar los reactivos BMPH ((N-[ácido β-maleimidopropiónico]hidrazida)•TFA), KMUH ((N-[ácido k-maleimidoundecanoico]hidrazida), y MPBH (clorhidrato de hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico) para reticular el indicador que contiene un sulfhidrilo libre en forma de un residuo de cisteína o una proteína derivada químicamente reducida para generar un grupo reactivo sulfhidrilo a carbohidratos. Esto puede ser particularmente importante para un soporte sólido que es un

60

carbohidrato complejo (por ejemplo, papel, membranas de base celulosa, geles o resinas) o puede estar recubierto o tratado con una solución de carbohidrato para generar una superficie reactiva de forma adecuada.

5 **[0059]** Para cada tipo de soporte, el indicador se puede formular en una solución que aumenta la unión y/o estabiliza la proteína unida. Dichas formulaciones incluyen soluciones que contienen hasta un 10% (p/v) de sacarosa, sorbitol, manitol, celulosa o polietilenglicol (PEG). Además, el indicador se puede formular como parte de un gel que se aplica a la superficie o canal de un soporte adecuado. Algunos ejemplos incluyen matrices de alginato, agar o poliacrilamida.

10 **[0060]** El indicador también puede comprender un agente para estabilizar el indicador y se seleccionan agentes de estabilización adecuados entre iones metálicos, azúcares, alcoholes de azúcares y agentes formadores de geles.

[0061] Para facilitar la utilización del indicador, el indicador puede comprender además medios para unir el soporte sólido a una superficie, tal como una proyección, hueco o apertura para la unión del soporte a una superficie
15 mediante un tornillo, tuerca y perno o abrazadera.

Kits que comprenden el indicador biológico

[0062] En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un kit para utilizar en la validación de un proceso de
20 tratamiento en que se reduce la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, que comprende:

- (i) un indicador de proceso biológico según el primer aspecto de la invención, y
- (ii) un sustrato para la quinasa termoestable.

25 **[0063]** Para llevar a cabo la medición de la cantidad/actividad de quinasa, el kit puede incluir medios para detectar ATP, por ejemplo, luciferina/luciferasa y opcionalmente un luminómetro. En una realización, el sustrato para la quinasa termoestable es ADP.

30 **[0064]** A partir de análisis previos con contaminantes conocidos, se pueden preparar datos que correlacionan la reducción en la cantidad o actividad del contaminante con actividad quinasa, y por tanto, el kit también puede incluir una o más tablas de búsqueda que correlacionan la actividad quinasa con la reducción en la cantidad o actividad de una lista de contaminantes especificados. En una realización, el kit es para monitorizar la desactivación de TSE. En una realización adicional, el kit se utiliza para monitorizar la desactivación de norovirus.

35 Utilización del indicador biológico

[0065] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico como un indicador de procesos biológicos para validar un proceso de
40 tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra.

[0066] En una realización, el indicador de procesos biológicos se formula según el primer aspecto de la invención.

[0067] En una utilización particular de la invención, un indicador según el primer aspecto de la invención es el informador en un método de indicación de la posible presencia de un contaminante (por ejemplo, un agente
45 infeccioso) después de un proceso de limpieza o desactivación. En primer lugar, se expone una muestra que contiene el indicador a un procedimiento de limpieza/desactivación (por ejemplo, uno o más de una temperatura, pH o concentración de proteasa seleccionados). La siguiente etapa es eliminar cualquier actividad enzimática contaminante mediante tratamiento térmico, por ejemplo, desde 60 a 80°C durante por lo menos 10 minutos (es decir, bajo condiciones que no afectan de manera significativa a la quinasa termoestable). A continuación, el
50 indicador reacciona a una temperatura entre 30°C y 70°C con un sustrato (por ejemplo ADP) para permitir la generación de ATP. La formación de ATP se puede medir mediante detección bioluminiscente utilizando luciferina/luciferasa y un luminómetro adecuado a 20-30°C durante 10 minutos a 1 hora. La lectura de salida de luz del luminómetro proporciona una lectura de la actividad residual de quinasa, es decir, la actividad de la quinasa después de la exposición al tratamiento de limpieza/desactivación. En base a los datos que se han derivado
55 previamente de experimentos separados, el método se completa mediante la correlación de la actividad residual de quinasa con la posible presencia de un contaminante en la muestra tratada.

[0068] En una realización, se puede eliminar la actividad enzimática contaminante o ATP en una muestra mediante una etapa de tratamiento inicial (por ejemplo, una temperatura, pH o concentración de proteasa seleccionados),
60 antes de la adición del indicador.

[0069] A continuación, se describe la utilización del indicador de la invención para monitorizar/validar una variedad de procesos.

5 **[0070]** En una realización, el indicador se utiliza para validar el rendimiento de una preparación de lavado biológico en un ciclo de lavado. Aunque la validación de un ciclo de lavado sería potencialmente útil en un entorno doméstico, su uso más ventajoso sería en un entorno de preparación sanitaria, farmacéutica o alimenticia, por ejemplo, para validar la descontaminación de ropa de cama, vestidos u otros objetos asociados con pacientes sufren o están
10 expuestos a agentes infecciosos (por ejemplo, un brote de *Staphylococcus aureus* (MRSA) o virus Norwalk/del tipo Norwalk resistentes de metilina). En este contexto, el indicador de la invención tiene la ventaja de que es relevante para el material biológico, tal como sangre u otros fluidos biológicos.

[0071] Para la validación de un ciclo de lavado, el indicador puede estar reticulado sobre una vara flexible, una tira de ropa u otro material adecuado para la inclusión en el ciclo. El indicador se pone en el equipo de lavado con el
15 resto de la carga. En una realización, el indicador se puede fijar en un soporte adecuado en el interior del equipo de lavado para facilitar su recuperación.

[0072] A continuación, se realiza el ciclo de lavado y se extrae el indicador y se evalúa antes de cualquier manipulación o procesado adicional de la carga, utilizando un "lector" que se ha calibrado para indicar un nivel
20 aceptable de actividad residual de quinasa en el indicador – derivando el nivel aceptable de la calibración y la valoración previas del rendimiento de lavado adecuado en el proceso. Dicha valoración podría incluir los niveles globales de suciedad y el recuento viable de microorganismos valorado utilizando organismos modelos adecuados conocidos por los expertos en la materia. En base a la lectura calibrada, la carga se pasa para el procesamiento posterior o se repite el ciclo de lavado.

25 **[0073]** En una segunda realización, el indicador se utiliza para validar procesos para la desactivación de virus. La detección de aislados virales vivos en el medio ambiente es problemática, particularmente cuando están asociados con una situación de emergencia donde la velocidad y la precisión pueden ser críticas. La presente invención proporciona la posibilidad de desarrollar sistemas indicadores que permiten la monitorización de procedimientos de
30 descontaminación esencialmente a tiempo real. Esto sería particularmente valioso para la descontaminación de superficies en instalaciones sanitarias y relacionadas después de un brote (por ejemplo de virus de tipo Norwalk) o una liberación deliberada de un agente viral (tal como la viruela).

[0074] El indicador para validar un proceso d desactivación viral puede tener una variedad de formas diferentes, por
35 ejemplo, una vara o una tira reactiva para monitorizar un área pulverizada o sumergida con virucida, o un indicador suspendido para la monitorización de un proceso de contaminación en fase gaseosa. Alternativamente, el indicador se puede pulverizar sobre una superficie antes de la contaminación y posteriormente se pueden evaluar los niveles de actividad residual de quinasa mediante la recogida de muestras con hisopo de la superficie.

40 **[0075]** En una realización adicional de la invención, el indicador se utiliza para validar la degradación de proteasas de toxinas proteicas bacterianas, toxinas vegetales, tales como ricina, y otras proteínas, péptidos o análogos de péptidos tóxicos.

[0076] Las proteasas muestran un potencial significativo para la degradación de una amplia gama de toxinas
45 proteicas que son potenciales agentes de amenaza de guerra bacteriológica/bioterror que incluyen la toxina botulínica, toxinas de ántrax y ricina. También presentan potencial para desactivar una amplia gama de otros agentes proteicos o peptídicos potencialmente tóxicos o dañinos para permitir la descontaminación de superficies/instalaciones o la eliminación segura de materiales. En este contexto, el indicador de la invención, junto con la superficie/material a descontaminar, se someten al procedimiento de descontaminación con proteasas. Al final
50 del procedimiento, la actividad residual de quinasa del indicador se evalúa según el método de la invención. A continuación, se correlaciona el nivel de actividad residual de quinasa con los índices de desactivación para la toxina o grupo de toxinas proteicas particulares. Suponiendo que el nivel de actividad es igual o inferior al valor del índice definido, entonces el material se puede desechar de manera segura o la superficie/instalación se puede volver a utilizar.

55 **[0077]** En una realización, se construye un margen de seguridad adecuado en la calibración de los índices de desactivación para permitir cualquier variabilidad del rendimiento del proceso. La estabilidad adicional de las enzimas utilizadas en esta invención permite hacerlo con una mayor certeza y un mayor rango dinámico que el rango amplio de otros indicadores enzimáticos, que incluyen los de organismos "termoestables", tales como *Bacillus*
60 *stearothermophilus*, tal como se muestra por los datos que muestran la estabilidad térmica relativa de AK de

organismos termófilos (figura 1, ejemplo 2).

5 **[0078]** El indicador también se puede utilizar para validar procedimientos de descontaminación con proteasas para limpiar aparatos de producción farmacéutica. Una amplia variedad de productos farmacéuticos utilizan materiales de humanos o animales que podrían estar contaminados con una amplia variedad de agentes, que incluyen agentes priones (TSE) y virus (por ejemplo, virus del oeste del Nilo, hepatitis, VIH). Los riesgos se pueden exacerbar cuando el origen del material es de origen animal (por ejemplo, suero de ternera fetal, inmunoglobulinas de caballo) y cuando una etapa intermedia del procesado puede implicar el riesgo de incrementar la concentración de patógenos no identificados en una muestra concreta. La posibilidad de utilizar una proteasa para limpiar instalaciones y aparatos de fabricación (por ejemplo, columnas de cromatografía, recipientes, conductos) entre los lotes de fabricación presenta el potencial de reducir o eliminar dichos riesgos, incluso cuando el contaminante no se ha identificado de forma oficial. Esto es particularmente cierto para agentes priones, por ejemplo, aparatos de fraccionamiento de sangre donde existe un riesgo significativo de acumulación y de implicación de un riesgo de infección en el producto final.

10
15 **[0079]** Para validar este tipo de procedimiento, el indicador de la invención se formula de manera ideal como una tira reactiva a sumergir en la solución de tratamiento con proteasas o como un cartucho a unir en línea con el aparato a limpiar. Mediante la evaluación de los niveles de actividad residual de quinasa en el dispositivo indicador después del tratamiento y la correlación de éstos con los niveles aceptables de limpieza, se puede desarrollar un seguimiento del rendimiento rápido y fiable.

[0080] En otra realización de la invención, el indicador se utiliza para validar la desactivación en fase gas de contaminantes, tales como TSE.

25 **[0081]** El potencial del ozono u otros esterilizantes en fase gas para desactivar dichos contaminantes ha sido sugerido por una amplia gama de publicaciones y artículos, aunque, por ahora, ningún método se ha mostrado explícitamente eficaz. Para ayudar en el desarrollo e introducción de esta tecnología en fase gas en la sanidad, será necesario un medio de validación del rendimiento de la tecnología. Como se ha observado que los agentes, tales como TSE, son mucho más resistentes a esta forma de desactivación que los agentes virales o bacterianos convencionales, los métodos disponibles actualmente para validar la desactivación en fase gas no son probablemente adecuados. La presente invención se refiere a este problema.

30 **[0082]** Para este tipo de validación, el indicador se une sobre un soporte sólido mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, la adsorción general y la reticulación química mediante enlaces amida, peptídicos, carbonílicos o cisteína. Por ejemplo, para la esterilización con ozono, se puede utilizar un soporte de cloruro de polivinilo (PVC) rígido, vidrio, acero, poliamida o polipropileno, con el indicador acoplado al soporte mediante cualquiera de los métodos descritos previamente. A continuación, el indicador se incluye en el lote de materiales/instrumentos a esterilizar, se expone al ozono, y se valora frente a un índice de desactivación calibrado de manera adecuada diseñado para evaluar la desactivación correspondiente del agente en cuestión. La desactivación satisfactoria permite el procesado posterior o la utilización del material/instrumentos.

35 **[0083]** El indicador opcionalmente puede estar unido a la cara interna de un tubo o espacio interno equivalente, de manera que se limita la penetración del gas. Esto proporciona un seguimiento que es adecuado para valorar la penetración del gas en espacios equivalentes en instrumentos con canales o a través de cargas de material empaquetado. Alternativamente, el indicador se puede unir a materiales porosos, tales como microesferas poliestireno, o se puede inmovilizar en un gel o resina.

40 **[0084]** En una realización adicional de la invención, el indicador se utiliza para validar sistemas de esterilización química líquida (por ejemplo, Endoclenz), tal como se utiliza para procesar endoscopios y equipo relacionado.

45 **[0085]** Habitualmente se utiliza una amplia gama de endoscopios en medicina y son una parte importante del diagnóstico y el tratamiento médico. Estos instrumentos son extremadamente sensibles y han supuesto un problema muy significativo para el lavado y desinfección rutinarias. Tradicionalmente, y aún existente en la práctica actual, los endoscopios se limpian a mano antes de descontaminarse utilizando un método de baja temperatura. Se ha desarrollado una gama de desinfectantes químicos y aparatos de reprocesado automatizados para tratar las partes específicas de piezas sensibles a la descontaminación de equipos, tales como endoscopios, en los que no es posible el autoclave tradicional. Estos métodos han ayudado a reducir los niveles de contaminación en la dificultad de limpiar instrumentos, que se ha asociado con la transmisión yatrogénica de una amplia gama de patógenos virales y bacterianos. El método actual de validación de dichos procesos es el seguimiento de la velocidad de flujo y la temperatura de la solución de lavado. El indicador de la invención proporciona un medio de validación adicional

que proporciona una lectura de la eficacia real de limpieza en los canales del endoscopio.

[0086] Para este tipo de validación, el indicador se une a la superficie interna de un tubo diseñado para tener un diámetro interno global similar al del tubo del endoscopio. Este aparato indicador se conecta en serie al endoscopio en el aparato de reprocesado automático. A continuación, el endoscopio se procesa de la manera normal. Al final del proceso, preferentemente antes de extraer el endoscopio del aparato, se separa el indicador y se valor el nivel de actividad quinasa restante. El nivel de actividad se puede correlacionar con los umbrales definidos anteriormente para al rendimiento aceptable del proceso y, en base a esta valoración, el endoscopio se puede transferir para una limpieza o descontaminación adicional o prepararse para su uso. Si el nivel de rendimiento no es adecuado, entonces el instrumento se puede reprocesar (utilizando las mismas condiciones o más rigurosas) con un nuevo indicador unido tal como se ha indicado previamente. El aparato indicador también es adecuado para validar la limpieza manual del endoscopio y/o cualquier otro instrumento con un canal.

[0087] En una realización adicional de la invención, el indicador se utiliza para el seguimiento del rendimiento de la limpieza de rutina en equipos de lavado-desinfección, tales como los utilizados en hospitales.

[0088] En otra realización de la invención, el indicador se utiliza para monitorizar los tratamientos con glutaraldehído u orto-ftaldehído (OPA). El glutaraldehído y formaldehído se han utilizado ampliamente como esterilizantes durante muchos años. Los desinfectantes químicos trabajan multiplicando las proteínas reticulantes de una manera no específica para destruir su función. El ortoftaldehído (OPA) ha aparecido recientemente como un nuevo desinfectante en esta familia y se está utilizando ampliamente ya que evita parte de los problemas de toxicidad asociados con el glutaraldehído. El indicador de la invención es adecuado para el seguimiento de toda esta clase de desinfectantes químicos, ya que las quinasas son sensibles al reticulado no específico de este tipo. El indicador puede estar unido covalentemente a una superficie adecuada y exponerse a un esterilizante químico junto con los otros productos a esterilizar. La eficacia del proceso se evalúa midiendo la actividad residual de la enzima del indicador. Esta actividad se compara con los valores umbrales definidos que indican el rendimiento correcto del proceso.

[0089] La utilización de diferentes tipos de quinasa puede proporcionar una sensibilidad o susceptibilidad al proceso según sea necesario para diferentes aplicaciones. Las adenilato quinasas termoestables descritas en esta memoria se pueden clasificar ampliamente en dos grupos basados en su arquitectura molecular. De este modo, las enzimas de la especie *Sulfolobus* son ejemplos de enzimas que presentan una estructura trimérica con un núcleo central hidrofóbico que es el determinante principal en el mantenimiento de su actividad a altas temperaturas. El segundo grupo de enzimas son monoméricas, ejemplificadas por las adenilato quinasas de la especie *Thermatoga*, pero tienen una cadena polipeptídica ligeramente más larga con un dominio "tapa" adicional que afecta al sitio activo. Estos tipos diferentes de enzimas termoestables mostrarán una sensibilidad diferencial a este tipo de esterilizante químico debido a la flexibilidad variable de sus cadenas peptídicas durante la acción de la enzima. Para cualquier tipo de esterilizante y/o concentración un cribado empírico identificará enzimas con susceptibilidades adecuadas para monitorizar y validar estos tipos de agentes químicos.

[0090] En una realización adicional de la invención, el indicador se utiliza como un seguimiento de lectura ultrarrápida para óxido de etileno, peróxido de hidrógeno u otros procesos en fase gas.

[0091] Actualmente una amplia gama de esterilizantes en fase gas son utilizados por un conjunto de fabricantes para la desinfección rutinaria de agentes bacterianos y virales. Los métodos actuales explotan las propiedades oxidativas de los gases para destruir las uniones peptídicas. Por tanto, las quinasas de la presente invención, con sus propiedades fisicoquímicas robustas, son ideales para proporcionar una lectura muy rápida de la desactivación. El indicador en este ejemplo es similar a los descritos previamente, por ejemplo, en relación con la desactivación con ozono de agentes, tales como TSE.

[0092] Un punto particularmente desafiante para los procesos de esterilización y descontaminación es la capacidad de validar la esterilidad de grandes cantidades líquidos voluminosos, como puede ser necesario en la fabricación de varias medicinas u otros productos farmacéuticos. Mientras que los métodos actuales monitorizan los parámetros de temperatura, tiempo y/o presión de un proceso particular (dependiendo de su exacta naturaleza), existen pocos métodos disponibles, si los hay, para validar la esterilización real en el líquido voluminoso. Esto es difícil incluso en volúmenes de alrededor de 1 litro, pero es casi imposible a volúmenes más grandes.

[0093] La presente invención proporciona un conjunto de posibles soluciones para tratar este problema. En su forma más simple, el indicador se puede añadir al líquido a esterilizar en una concentración adecuada para medir niveles definidos de desactivación de quinasa el final del proceso y equiparlos a los niveles de esterilización. Aunque esto

no sería deseable en ciertos tipos de procesos, la naturaleza inerte de la quinasa y la omnipresencia de actividades enzimáticas equivalentes en todos los organismos, puede hacerlo aceptable. La aceptabilidad se puede mejorar por el hecho de que muchas enzimas termoestables están altamente condensadas y, de este modo, tienen una inmunogenidad muy baja después de la inoculación en animales.

5

[0094] Cuando dichas adiciones directas no son aceptables, el indicador se puede añadir al líquido voluminoso en una bolsa de diálisis, recipiente poroso o se puede inmovilizar a un soporte adecuado, de manera que no se libera ninguna parte del indicador en el líquido voluminoso, sino que las condiciones esterilizantes trabajan en el indicador de la misma manera que para toda la muestra. Para los expertos en la materia son conocidas una amplia variedad de maneras posibles de contener o inmovilizar proteínas para permitir la difusión general de la muestra líquida, pero limitando el movimiento de la muestra indicadora. Los posibles ejemplos incluyen, pero sin limitación, membranas de diálisis, tubos Visking, membranas porosas, resinas de unión a proteínas, geles rígidos o soportes sólidos tal como se han descrito para los otros indicadores dados a conocer. El indicador se puede unir a la superficie mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, o simplemente recubrirse en una membrana adecuada sin unión, de manera que el indicador se puede extraer simplemente de líquido voluminoso al completar el proceso.

10

15

Método de validación de un proceso de tratamiento

[0095] En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método de validación de un proceso de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, que comprende las etapas de:

20

- (a) obtener una muestra que contiene o es sospechosa de contener un contaminante;
- (b) someter la muestra a un proceso de tratamiento en presencia de una cantidad definida de una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico;
- (c) medir la actividad residual de quinasa y opcionalmente calcular la reducción en la actividad de quinasa; y
- (d) comparar dicha actividad residual de quinasa con una actividad de quinasa predeterminada, o comparar dicha reducción en la actividad de quinasa con una reducción predeterminada en la actividad de quinasa, donde la actividad predeterminada de quinasa o la reducción predeterminada en la actividad de quinasa corresponde a una reducción confirmada en la cantidad o actividad del contaminante bajo las mismas condiciones.

25

30

[0096] Es posible que la muestra en la etapa (a) no pueda contener ningún contaminante. El punto de la validación es que, después de llevar a cabo el tratamiento, se confirme que cualquier agente que podría haber estado presente se haya eliminado/desactivado hasta un grado aceptable. En general, sin embargo, se sabe que la muestra contiene, o es sospechosa de contener el contaminante.

35

[0097] En una realización, la quinasa termoestable en la etapa (b) del método se formula como un indicador según el primer aspecto de la invención.

[0098] En otra realización, la actividad residual de quinasa en la etapa (c) se mide añadiendo un sustrato que comprende ADP a la quinasa residual y midiendo la formación de ATP. La formación de ATP se puede medir mediante detección bioluminiscente utilizando luciferina/luciferasa y un luminómetro adecuado.

40

[0099] Habitualmente, un operador mide la actividad de quinasa antes de tratar la muestra y después de tratar la muestra. También es posible que la quinasa contaminante, normalmente mesofílica, pueda entrar en la muestra antes de analizar la actividad de quinasa. De este modo, en una realización de la invención, el ensayo incluye la etapa de desactivar la quinasa mesofílica, tal como mediante el tratamiento de la muestra a 70 grados C durante por lo menos 30 minutos, o a 80 grados C durante por lo menos 10 minutos, antes de medir la actividad residual de quinasa.

45

[0100] En una realización, la quinasa, antes del tratamiento, tiene una actividad de por lo menos 10.000.000 Unidades Relativas de Luz (RLU) por mg de quinasa, o por lo menos 8.000.000 RLU por mg de quinasa, o por lo menos 5.000.000 RLU por mg de quinasa, o por lo menos 3.000.000 por mg de quinasa, o por lo menos 1.000.000 RLU por mg de quinasa, o por lo menos 500.000 RLU por mg de quinasa, cuando se mide en presencia de luciferina/luciferasa mediante un luminómetro.

50

[0101] En otra realización de la invención, la actividad predeterminada de quinasa es inferior a 10.000 RLU por mg de quinasa, o inferior a 1000 RLU por mg de quinasa, o inferior a 500 RLU por mg de quinasa, o inferior a 250 RLU por mg de quinasa, o inferior a 100 RLU por mg de quinasa, o inferior a 10 RLU por mg de quinasa, o inferior a 1 RLU por mg de quinasa, o es 0 RLU por mg de quinasa.

55

60

[0102] En una realización adicional de la invención, la reducción predeterminada en la actividad de quinasa es igual o superior a una reducción de una vez logarítmica, o una reducción de dos veces logarítmicas, o una reducción de tres veces logarítmicas, o una reducción de cuatro veces logarítmicas, o una reducción de cinco veces logarítmicas, o una reducción de seis veces logarítmicas, o una reducción de siete veces logarítmicas, o una reducción de ocho veces logarítmicas o una reducción de nueve veces logarítmicas en la actividad de quinasa.

[0103] En otra realización, la reducción predeterminada en la actividad de quinasa corresponde a una reducción de tres veces logarítmicas, o una reducción de seis veces logarítmicas, o una reducción de siete veces logarítmicas, o una reducción de ocho veces logarítmicas, o una reducción de nueve veces logarítmicas, en la cantidad o concentración de la quinasa. En realizaciones adicionales, la reducción predeterminada en la actividad de quinasa corresponde a una reducción en RLU de por lo menos 800.000, o por lo menos 900.000, o por lo menos 950.000, o por lo menos 990.000, o por lo menos 999.000, o por lo menos 999.900, o por lo menos 999.990, o por lo menos 999.999 RLU.

[0104] En otra realización de la invención, la reducción confirmada en la cantidad o actividad del contaminante en la muestra es de por lo menos 3 veces logarítmicas, por lo menos 6 veces logarítmicas, preferiblemente por lo menos 7 veces logarítmicas, más preferiblemente por lo menos 8 veces logarítmicas, lo más preferiblemente por lo menos 9 veces logarítmicas.

[0105] En otra realización de la invención, se continúa el tratamiento hasta que la actividad residual de quinasa o la reducción en la actividad de quinasa corresponde a una reducción confirmada en la cantidad o actividad del contaminante de por lo menos 3 veces logarítmicas, por lo menos 6 veces logarítmicas, o por lo menos 7 veces logarítmicas, o por lo menos 8 veces logarítmicas o por lo menos 9 veces logarítmicas.

[0106] En una realización de la invención, el método comprende además la etapa de registrar los datos obtenidos en la etapa (c) en un portador de datos adecuado.

Método de correlación

[0107] En un quinto aspecto, la invención proporciona un método de correlación de la reducción en la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra con la actividad de quinasa de un indicador de procesos biológicos descrito en relación con el primer aspecto de la invención. Este método comprende:

(i) preparar una muestra que contiene una cantidad definida del contaminante y una muestra que contiene una cantidad definida del indicador según el primer aspecto de la invención, o preparar una única muestra que contiene una cantidad definida del contaminante y una cantidad definida del indicador según el primer aspecto de la invención;

(ii) someter la muestra o muestras a un tratamiento;

(iii) medir la actividad residual del indicador quinasa y opcionalmente calcular la reducción en la actividad de quinasa;

(iv) medir la cantidad o actividad residual del contaminante y opcionalmente calcular la reducción en la cantidad o actividad del contaminante;

(v) repetir las etapas (i) a (v), donde se cambia por lo menos uno de los parámetros del tratamiento.

[0108] En una realización, el parámetro del tratamiento comprende uno o más de tiempo, temperatura, pH, presión, concentración de proteasa y concentración de esterilizante o detergente.

[0109] En una realización particular, el tratamiento comprende calentar la muestra o muestras a 50-140°C, o 80-100°C, o 134-138°C; el parámetro de tratamiento es el tiempo; y se repiten las etapas (i) a (iv) mediante el sometimiento de la muestra o muestras a dicho tratamiento durante periodos de 1, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos.

[0110] En una realización adicional, el tratamiento comprende exponer la muestra o muestras a un pH de 9-14 o pH 12 o superior, o aproximadamente pH 12; el parámetro de tratamiento es el tiempo; y se repiten las etapas (i) a (iv) mediante el sometimiento de la muestra o muestras a dicho tratamiento durante periodos de 1, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos.

[0111] En otra realización, el tratamiento comprende exponer la muestra o muestras a una proteasa a una concentración de 0,5-2 mg/ml, o aproximadamente 1 mg/ml, o aproximadamente 2 mg/ml; el parámetro de tratamiento es el tiempo; y se repiten las etapas (i) a (iv) mediante el sometimiento de la muestra o muestras a dicho tratamiento durante periodos de 1, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. El método anterior permite la preparación de datos de

calibración para la utilización futura del indicador para la validación de un tratamiento en muestras que contienen, o son sospechosas de contener contaminante. La calibración de un conjunto de procesos de tratamiento se describe en WO2005/093085.

5 Sección de definiciones

[0112] El término "contaminante" comprende agentes infecciosos y no infecciosos derivados de una fuente biológica. Ejemplos de contaminantes incluyen bacterias, virus, hongos, priones, toxinas, alérgenos, esporas, cualquiera de los agentes indicados anteriormente como componentes biológicos y fragmentos y derivados de cualquiera de los anteriores. En el contexto de la invención, un contaminante también puede referirse a un agente biológico contaminante.

[0113] El término "reticulado" se refiere a la unión de dos entidades a través de uno o más enlaces covalentes. La reticulación puede ser química o genética. La reticulación genética comprende indicadores preparados como proteínas de fusión.

[0114] El término "muestra" comprende cualquier producto, instrumento, superficie, fluido o material. Ejemplos incluyen, pero sin limitación, muestras clínicas (tales como sangre completa, suero, muestras orales, tales como saliva, pus, muestras vaginales, muestras de heces, vómitos), muestras ambientales (tales como muestras de agua, tierra, aire). Instrumentos quirúrgicos y médicos, placas de microtitulación, tiras reactivas, dispositivos de flujo lateral, vestimenta de hospital, ropa de cama, líquidos voluminosos, material de animal sacrificado, productos farmacéuticos, banquetas de trabajo, paredes y suelos, matrices biológicas

[0115] El término "tratamiento" o "proceso de tratamiento" comprende cualquier proceso que se diseña para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra. Los tratamientos adecuados incluyen uno o más de: un pH seleccionado (por ejemplo, por debajo de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, o por encima de pH 7, 8, 9, 10 ó 11, o aproximadamente pH 12), temperatura seleccionada (por ejemplo, por lo menos 40C, 50C, 60C, 70C, 80C, 90C, 100C, 110C, 120C, 130C, 140C, 150C, ó 160C, o entre 50-120C) o presión seleccionada (por ejemplo, por lo menos 50 kPa, 70 kPa, 100 kPa, 150 kPa, 200 kPa, ó 250 kPa), exponer la muestra a una proteasa u otra enzima lítica, exponer la muestra a un detergente, un esterilizante químico, radiación, radicales libres, o un esterilizante en fase gas. En una realización, el tratamiento se diseña para reducir la actividad infecciosa (también conocida como infectividad) de un contaminante biológico infeccioso, tal como TSE. El término "tratamiento" o "proceso de tratamiento" también comprende procesos de limpieza y desactivación, tales como autoclave a temperatura elevada con vapor de agua húmedo o seco, esterilización con ozono, esterilización con H₂O₂, enfoscar u otro método diseñado para eliminar o desactivar el contaminante. En otra realización de la invención, tanto el indicador como el contaminante se exponen directamente al proceso de tratamiento, es decir, no existe un sellado o barrera entre el indicador /contaminante y el proceso de tratamiento. Por lo tanto, el indicador y el contaminante están ambos en contacto con el proceso de tratamiento y están sujetos a las mismas condiciones de tratamiento.

[0116] El término "componente biológico" comprende cualquier molécula biológica que puede estar unida covalentemente a una enzima quinasas. El componente biológico se puede seleccionar entre una proteína, un ácido nucleico, un lípido o un carbohidrato. El componente biológico es de manera adecuada un mimético o sustituto del contaminante en la muestra a tratar y, por lo tanto, reacciona al proceso de tratamiento sustancialmente la misma manera que el contaminante. En una realización, el componente biológico puede ser el mismo, pero físicamente distinto, que el contaminante en la muestra que se somete al proceso de tratamiento, por ejemplo si el contaminante es una proteína, entonces el componente biológico es también una proteína; si el contaminante es una proteína de la sangre, el componente biológico es también una proteína de la sangre; si el contaminante es una molécula de ADN, entonces el componente biológico es también una molécula de ADN; si el contaminante es una molécula de ARN, entonces el componente biológico es también una molécula de ARN, etc. para cada uno de los contaminantes y componentes biológicos descritos en esta memoria. En otra realización, el componente biológico es diferente del contaminante. En una realización de la invención, el componente biológico no es un péptido, proteína o polipéptido. En una realización adicional de la invención, el componente biológico no es un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda de oligonucleótido específica para HPV16). En otra realización adicional de la invención, el componente biológico no es lectina, factor de crecimiento, aptámero ADN/ARN, bacteriófago, o un agente de unión específico para un analito.

[0117] El término "proteína" comprende cualquier molécula que contiene proteína o péptido. Los términos "proteína", "péptido", y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

[0118] El término "proteína de sangre" comprende cualquier proteína que esté presente en la sangre. Ejemplos

específicos incluyen proteínas de coagulación de la sangre (por ejemplo, fibrinógeno, péptidos de fibrina, fibrina, sustratos de transglutaminasa, trombina), proteínas del suero (por ejemplo, albúmina y globulina), plaquetas, glicoproteínas de células sanguíneas y hemoglobina.

- 5 **[0119]** El término "proteína bacteriana" comprende cualquier proteína que deriva de una bacteria. Los ejemplos específicos incluyen proteína fimbrial bacteriana (por ejemplo, CgsA de *E.coli* y AgfA de *Salmonella*), una toxina proteica bacteriana (por ejemplo, toxinas de *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*), una proteína de la superficie celular bacteriana (por ejemplo, adhesinas de la superficie celular de bacterias formadoras de flóculos y bacterias filamentosas en lodo activado, peptidoglicano, lipoproteínas), y una proteína de espora bacteriana (por ejemplo, de bacterias Gram positivas y que tiene una secuencia similar o estructura global con las proteínas que forman los apéndices de los lazos en *Clostridium taeniosporum*, proteínas chaplina A-H y proteínas rodlin A y Rd1B de *Streptomyces spp.*).

- 15 **[0120]** El término "proteína viral" comprende cualquier proteína que deriva de un virus. Ejemplos específicos incluyen una proteína de cubierta viral, una proteína de envoltura viral, una proteína de cápside viral y una proteína de núcleo viral. En una realización, las proteínas virales son de un virus bacteriófago (por ejemplo, las proteínas de cubierta MS2 y PP7), virus norwalk (por ejemplo, proteína de cápside), rotavirus (por ejemplo, proteínas VP2, VP6 y VP7), coronavirus (por ejemplo, proteínas S, E y M de SARS), lengua azul (por ejemplo, proteína VP2), virus del papiloma humano (por ejemplo, proteína estructural principal viral, L1), hepatitis B (por ejemplo, proteína de envoltura pequeña HBsAg), Hepatitis C (por ejemplo, proteínas E1 y E2 del núcleo), gripe (por ejemplo neuraminidasa y hemaglutinina y proteínas de matriz), poliovirus (por ejemplo, proteínas de la cápside VP0, 1 y 3), VIH (por ejemplo, proteínas de la envoltura, Pr55gag) y dengue B (por ejemplo, envoltura (e) y pre-membrana/membrana (prM/M)).

- 25 **[0121]** El término "proteína fúngica" comprende cualquier proteína que deriva de un hongo. Ejemplos específicos incluyen proteínas de hidrofobina (por ejemplo SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*, y proteínas equivalentes de levadura), proteínas de esporas fúngicas, proteínas hifales, micotoxinas, y priones fúngicos (por ejemplo Sup35, Het S, Ure 2, Rnq1, New 1).

- 30 **[0122]** El término "proteína autoagregante" comprende cualquier proteína que es capaz de autoagregarse o autoensamblarse en fibrilas amiloides o biopelículas reactivas en la superficie. Los ejemplos específicos incluyen priones (por ejemplo PrP^{Sc} y PrP^C, Het S, Ure 2, Rnq1, New 1), proteínas miméticas de priones, fibrilas amiloides, adhesinas de la superficie celular de bacterias formadoras de flóculos y bacterias filamentosas en lodo activado, proteína beta amiloide, proteína tau, proteína de unión a poliadenina, proteína C surfactante de pulmón, proteína CsgA de *E.coli*, proteína AgfA de especie *Salmonella*, proteínas fimbriales bacterianas, apolipoproteínas (por ejemplo, apolipoproteína A1), hidrofobinas de especies fúngicas (por ejemplo SC3 de *Schizophyllum commune*, RodA/B de *Aspergillus fumigates*), chaplinas (por ejemplo, Chps A-H de *Streptomyces spp.*), rodlinas (por ejemplo Rd1A y Rd1B de *streptomyces spp.*), proteínas de cubierta de esporas gram positivas (por ejemplo P29a, P29b, GP85 y un análogo de SpoVM), y proteínas de tipo cemento de percebe (por ejemplo, la proteína de 19kDa de *Balanus albicostatus*, y la proteína de 20kDa de *Megabalanus rosa*, y la nueva proteína de tipo cemento dependiente de calcita de *Balanus albicostatus*).

- 45 **[0123]** El término "ácido nucleico" comprende polímeros de nucleótidos de cualquier longitud o composición. Ejemplos específicos incluyen una molécula de ADN y una molécula de ARN. En una realización, el ácido nucleico se selecciona entre ADN de cadena sencilla (ssDNA), ARN de cadena sencilla (ssRNA), ADN de doble cadena (dsDNA) o ARN de doble cadena (dsRNA). En otra realización, dichas moléculas derivan de tejido neurológico.

- 50 **[0124]** El término "carbohidrato" comprende cualquier molécula que contiene carbohidrato. Ejemplos específicos incluyen exopolisacárido, lipopolisacárido (EPS/LPS, a veces conocidos como endotoxina) (por ejemplo de *Legionella*, *E.coli*, especie *Staphylococcus*, especie *Streptococcus*, especie *Pseudomonas*, especie *Acinetobactor*, especie *Campylobactor*, y especie *Bacillus*), peptidoglicano, componentes de la pared celular de plantas, hongos y levadura (por ejemplo, quitina, lignina, glucano), preparaciones de mucina, glicolípidos (especialmente, glicolípidos derivados del cerebro), glicoproteínas (por ejemplo, glicoproteínas de la superficie celular, Eap1p), extractos de esporas (por ejemplo de *Bacillus spp.*, *Clostridal spp.* y otros formadores de esporas), polisacáridos de cápsulas de levadura, y secreciones de invertebrados (por ejemplo de geles de moluscos).

- 55 **[0125]** El término "lípidos" comprende cualquier molécula que contiene lípidos. Ejemplos específicos incluyen glicolípidos (por ejemplo, glicolípidos derivados del cerebro), gangliósidos (por ejemplo, GT_{1b}, GT_{1a} y GM1), y aceites vegetales y lípidos.

60

[0126] Un "sustrato de transglutaminasa" es cualquier molécula que es un sustrato para una enzima transglutaminasa. Las transglutaminasas son una familia de enzimas (EC 2.3.2.13) que catalizan la formación de un enlace covalente entre un grupo amina libre (por ejemplo, lisina unida a proteína o péptido) y el grupo gamma-carboxamida de glutamina unida a proteína o péptido. Ejemplos de dichas enzimas incluyen el Factor VIII, la transglutaminasa de queratinocito y la transglutaminasa tisular. La fibrina, que actúa mediante el Factor VIII, es un ejemplo de sustrato de transglutaminasa.

[0127] Una "matriz o mezcla biológica" puede comprender uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. En una realización, puede ser una mezcla de proteínas, o puede comprender uno o más entre sangre, suero, moco, óvulo, tejido neurológico, comida o material de animal sacrificado. La matriz o mezcla biológica también puede ser una muestra contaminada de análisis disponible comercialmente, tal como suelo de Browne o suelo de Edimburgo. En una realización, la matriz/mezcla biológica tiene una composición similar a la matriz/mezcla en que está presente el contaminante. En el contexto de la invención, una matriz biológica, también puede referirse como muestra contaminada de análisis.

[0128] Un componente biológico que es un "mimético" o "sustituto" del contaminante es un componente que reaccionará al proceso de tratamiento de una manera muy similar (o sustancialmente la misma) que el contaminante. De manera similar, una matriz biológica que es "mimética" o "sustituta" de la muestra es una matriz que tiene una composición similar a la muestra y que reaccionará al proceso de tratamiento sustancialmente de la misma manera.

[0129] El término "anticuerpo" comprende inmunoglobulinas de longitud completa, y todos los fragmentos y derivados de las mismas, por ejemplo, una cadena pesada, una cadena ligera, un dominio constante, un dominio variable, una región Fab, una región Fc, etc. de una inmunoglobulina.

[0130] El término "fibrina" comprende todos los péptidos derivados de fibrina. Éstos incluyen los péptidos de fibrina de longitud completa y todos los fragmentos y derivados de la misma. Comprende todos los péptidos que tienen reactividad de fibrina, por ejemplo, péptidos que actúan por el Factor VII para formar un coágulo. El término fibrina o péptido de fibrina se puede utilizar indistintamente con el término "sustrato de transglutaminasa" a lo largo de esta memoria.

[0131] El término "salida de luz" significa la luz que se emite mediante la reacción de ATP con el reactivo luminiscente. Esta salida de luz se puede detectar utilizando tecnología completamente convencional, tal como un luminómetro estándar (por ejemplo, un luminómetro de 96 pocillos Berthold Orion o un luminómetro de soporte manual).

[0132] El término "quinasa informadora" se refiere a una enzima quinasa que no está presente de forma inherente en la muestra a analizar, es decir, la quinasa es exógena a la muestra. La quinasa informadora se añade a la muestra como un reactivo separado, por ejemplo, como una quinasa aislada. En una realización, las quinasas informadoras son termoestables.

[0133] El término "quinasa termoestable" se refiere a una quinasa que mantiene la actividad después de la exposición al calor, es decir, que no se ve relativamente afectada por las temperaturas elevadas. En una realización de la invención, las quinasas termoestables mantienen por lo menos un 70% de la actividad (u 80% de actividad, 90% de actividad, o 100% de actividad) después de la exposición a una temperatura entre 50 - 120 C. En otra realización, las quinasas termoestables mantienen por lo menos un 70% de la actividad (u 80% de actividad, 90% de actividad, 95% de actividad o 100% de actividad) después de la exposición a 40C durante 30 minutos, o después de la exposición a 50C durante 30 minutos, o después de la exposición a 60C durante 30 minutos, o después de la exposición a 70C durante 30 minutos, o después de la exposición a 80C durante 30 minutos, o después de la exposición a 90C durante 10 minutos, o después de la exposición a 120C durante 3 minutos. Las quinasas termoestables también pueden ser más resistentes que las quinasas no termoestables hasta un rango de otros procesos bioquímicos y físicos que normalmente dañan o destruyen proteínas o las desactivan, tal como la exposición a ciertos agentes químicos, por ejemplo, caótopos, daño por radicales libres, detergentes, extremos de pH, exposición a proteasas, reticulación de proteínas, encapsulación en membranas o polímeros no permeables o semipermeables, o inmovilización irreversible sobre superficies. En una realización particular, las quinasas termoestables pueden mantener por lo menos un 70% de la actividad (u 80% de actividad, 90% de actividad, 95% de actividad o 100% de actividad) después de la exposición a uno o más de los procesos bioquímicos y físicos descritos anteriormente. En todos los casos, esta "actividad mantenida" se puede confirmar fácilmente utilizando tests convencionales. Brevemente, la quinasa se incuba con ADP bajo las condiciones de tratamiento determinadas durante una cantidad de tiempo determinada y a continuación se analiza la actividad residual mediante la detección de la generación de ATP utilizando luciferina/luciferasa y un luminómetro. A partir de esto, se puede determinar el %

de actividad de quinasa mantenida después del tratamiento.

[0134] Los términos "quinasa" y "actividad quinasa" se utilizan indistintamente a lo largo de esta memoria.

- 5 **[0135]** El término "reactivo bioluminescente" se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias capaces de reaccionar con ATP para generar luz, por ejemplo, una mezcla de luciferina y luciferasa.

[0136] El término "RLU" significa Unidad Relativa de Luz. Las Unidades Relativas de Luz son una medición relativa, no absoluta. Los valores dados en la memoria se refieren a mediciones tomadas utilizando un luminómetro de microplacas de 96 pocillos Berthold Orion con un sistema inyector que utiliza un método "flash" de medición de luz durante 2 segundos inmediatamente después de la adición de los reactivos luciferasa/luciferina (fotomultiplicador de especificación técnica que mide la luz emitida a una longitud de onda de 300-650nm). Para tratar este punto, los fabricantes han generado datos para "factores" de RLU, que permiten normalizar los datos generados por un luminómetro determinado hasta un patrón calibrado. De este modo, se pueden realizar comparaciones entre diferentes instrumentos. El factor de RLU para el luminómetro de microplacas de 06 pocillos Berthold es 1. Por consiguiente, los valores de RLU proporcionados en la memoria se pueden considerar como valores de RLU estandarizados/normalizados.

[0137] En términos de valores absolutos, un valor de RLU se puede relacionar con la concentración de ATP requerida para proporcionar dicho valor con los reactivos descritos en el método. Como conversión aproximada, y dada la relación lineal entre los valores de RLU y la concentración de ATP, se pueden utilizar los siguientes valores:

RLU	Concentración aproximada de ATP/ μ M
12.000.000	1000
1.200.000	100
120.000	10
12.000	1
1.200	0,1
120	0,01

[0138] Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

[0139] A continuación, se describe la presente invención en realizaciones específica en los siguientes ejemplos y con referencia a los dibujos que se acompañan en los que:

La figura 1 muestra la actividad de enzimas adenilato quinasa (AK) después del tratamiento a 70°C (A), 80°C (B) y 90°C (C);

la figura 2 muestra la estabilidad térmica de una gama de enzimas AK expresadas recombinantemente en *E.coli*. Se clonaron y se expresaron los genes que codificaban las enzimas AK tal como se describe en el ejemplo 3. Todos los genes se expresaron a partir del vector pET28a a excepción del clon I de *S.acidocaldarius* que se expresó a partir de pET3a tal como se describe previamente. Los niveles de expresión fueron similares para cada clon, pero una parte de la enzima de *Pyrococcus furiosus* (P.fu) estaba en la fracción insoluble y es probable que esto haya reducido la cantidad de esta enzima a analizar. La estabilidad térmica de las enzimas recombinantes se midió después de la incubación a 80°C durante 30 minutos en un lisado de *E.coli* crudo a diluciones en serie de 10 veces a partir de proteína celular total 1 mg/ml (de manera que la columna 12 es equivalente a proteína total 1 fg/ml). Las enzimas de *Thermotoga maritima* y *Archaeoglobus fulgidus* mostraron una estabilidad significativamente mayor que las otras enzimas analizadas, aunque las enzimas restantes (*Sulfolobus solfataricus* (S.so P2), *Aeropyrum pernix* y P.fu) mostraron una actividad similar a la enzima de *S.acidocaldarius* utilizada como base de los ensayos previos (datos marcados como S.ac I);

la figura 3 muestra el análisis electroforético en gel (SDS-PAGE) de la expresión y purificación de fusiones de péptidos tAK-fibrina. Carril 1, marcadores Seebblue; Carril 2, homogenato celular completo; Carril 3, residuo celular insoluble (P1); Carril 4, sobrenadante (S1); Carril 5, S1 – residuo celular insoluble tratado con calor (P2); Carril 6, S1 – fracción soluble tratado con calor (S2); Carriles 7-12, fracciones de tAK-fibrina purificadas eluidas secuencialmente a partir de cromatografía de afinidad Cibacron Blue;

la figura 4 muestra el análisis por Espectrometría de Masas de las fusiones de péptidos tAK (Sac)-Fibrina purificadas y tAK (Sac) de tipo natural. Se aplicaron Sac (A) y Sac-Fibrina (B) purificados a un chip recubierto de silicio (NP), se dejó secar y se aplicó la matriz (ácido sinípico) para análisis de espectroscopía de masas SELDI. El

peso molecular se muestra en el eje de abscisas y la señal relativa en el eje de ordenadas. La adición del péptido de fibrina da lugar a un incremento en el peso molecular de Sac de 21170 Da (A) a 22188 Da (B) sin aparente degradación de dicho péptido. Las respectivas especies dímero y trímero de Sac también se pueden observar a 42324 Da y 63448 Da para Sac, y 44357 Da y 66494 Da para Sacfibrina;

5

la figura 5 muestra un análisis electroforético en gel (SDS-PAGE) de Sup35-tAK (Sac) solubilizado y replegado de preparados de cuerpos de inclusión aclarados. Carril 1, marcador SeeBlue Plus 2; Carril 2; Sup t35AK, replegado a partir de cuerpos de inclusión solubilizados (preparados en presencia del agente reductor, DTT) en Tris-HCl 20 mM pH 8,5; Carril 3, como el Carril 2, pero utilizando cuerpos de inclusión solubilizados preparados en ausencia de DTT; Carril 4, como el Carril 3, fracción insoluble; Carril 5, como el Carril 2, pero tratado con calor a 75°C durante 10 min, fracción soluble; Carril 6, como el Carril 3, tratado con calor a 75°C durante 10 min, fracción soluble; Carril 7, como el Carril 6, fracción insoluble; Carril 8, como el Carril 7, residuo celular lavado; Carril 9, como el Carril 2 concentrado en tubo de diálisis cubierto en PEG 10000; Carril 10, como el Carril 1. RV308 de *E. coli* que expresaba Sup35-tAK se cultivó a 30°C en matraces de agitación hasta una DO final a 600 nm de 14. La pasta celular centrifugada se resuspendió en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1% en 0,05 x volumen de cultivo. Las células se lisaron mediante sonicación. Se aislaron los cuerpos de inclusión del lisado celular crudo mediante centrifugación y se lavaron tres veces con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%. El peso final en húmedo del residuo celular lavado fue de 5 g/L de cultivo. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron a 15 mg/ml en CAPS 50 mM, pH 11 con N-lauroilsarcosina al 0,3% y +/- DTT 1 mM, se incubaron durante 1,75 horas a 20°C y se aclararon mediante centrifugación a 12.000 rpm en una centrífuga Sorval, rotor SS34 durante 10 minutos. A continuación, el sobrenadante que contenía la proteína solubilizada se dializó con 5 cambios de tampón (los primeros dos con DTT y el resto sin) antes de su utilización. La Sup35-tAK replegada se pudo preparar en formas soluble o insoluble mediante la solubilización de los cuerpos de inclusión en presencia o ausencia de DTT tal como se muestra en los Carriles 2 y 4, respectivamente. La Sup35-tAK soluble replegada demostró estabilidad contra el tratamiento térmico anterior;

la figura 6 muestra un análisis por microscopía electrónica de la formación de fibrilas de tAK-Sup35 (Sac). Los cuerpos de inclusión purificados se solubilizaron y replegaron tal como se ha descrito anteriormente (figura 5). La formación de fibrilas se indujo mediante la incubación a 4°C durante 24h - 72h a una concentración de proteínas de 2 mg/ml. Las muestras se analizaron mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) estándar utilizando acetato de uranilo como tinción negativa. Mediante las imágenes se pueden observar múltiples especies poliméricas (flechas). No se observaron especies de fibrilas a concentraciones de proteínas por debajo de 2 mg/ml;

la figura 7 muestra la reticulación de tAK a mucina porcina purificada utilizando SPDP. Carril 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, tAK conjugada a mucina; Carril 3, conjugado tAK-mucina reducido utilizando DTT. Después de la derivación con SPDP de tAK y mucina tal como se ha descrito previamente, se forman especies de conjugados de peso molecular elevado <200 kDa. No está presente tAK no conjugado en el Carril 2, demostrando una reticulación muy eficaz entre las dos especies de proteínas. La reducción del conjugado rompe los enlaces de reticulación dando lugar a la aparición de tAK libre tal como se indica en el Carril 3;

40

la figura 8 muestra el procesado de indicadores de tAK y mucina en un equipo de lavado-desinfección. La tAK en mucina se preparó mediante la adición de tAK no modificada a mucina porcina y dejando que la tAK se secase en la superficie del indicador. El conjugado de tAK-mucina se preparó tal como se ha descrito previamente utilizando SPDP para reticular la tAK a mucina. Los indicadores se procesaron en un equipo de lavado-desinfección validado utilizando 3E-zyme como detergente;

45

la figura 9 muestra el análisis por SDS-PAGE de la unión covalente de la proteína de fusión tAK-fibrina con fibrinógeno para formar una película de tAK-fibrina. Carril 1, marcadores SeeBlue2; Carril 2, control activado sin trombina de la reacción en la proporción 1:1000 de tAK-fibrina con respecto a fibrinógeno; Carril 3, como el Carril 2 – proporción de 1:500 tAK-fibrina: fibrinógeno; Carril 4, como el Carril 2, proporción de 1:250 tAK-fibrina:fibrinógeno; Carril 5, como el Carril 2, activado con trombina; Carril 6, como el Carril 3 activado con trombina; Carril 7, como el Carril 4 activado con trombina. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora en presencia o ausencia de 5 U de trombina, según sea necesario. La incorporación covalente óptima se consiguió a una proporción de tAK-fibrina:fibrinógeno de 1:1000 (Carril 5) con especies de peso molecular más elevado (<198 kDa) formadas tal como se indica, con una disminución concomitante de especies de tAK-fibrina no conjugadas (22,1 kDa).

55

SEQ ID Nos

[0140]

60

- SEQ ID 1** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus solfataricus*
SEQ ID 2 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*
SEQ ID 3 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus tokodaii*
SEQ ID 4 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus*
5 **SEQ ID 5** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*
SEQ ID 6 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus abyssi*
SEQ ID 7 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Methanococcus thermolithotrophicus*
SEQ ID 8 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Methanococcus voltae*
SEQ ID 9 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Methanococcus jannaschii*
10 **SEQ ID 10** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Methanopyrus kandleri*
SEQ ID 11 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Methanotorris igneus*
SEQ ID 12 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrobaculum aerophilum*
SEQ ID 13 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*
SEQ ID 14 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Aeropyrum pernix*
15 **SEQ ID 15** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Archaeoglobus fulgidus*
SEQ ID 16 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus abyssi* (adenilato quinasa monomérica (AdkE))
SEQ ID 17 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus* modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
SEQ ID 18 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii* modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
20 **SEQ ID 19** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius* modificada genéticamente para proporcionar una mayor estabilidad
SEQ ID 20 Secuencia proteica de Acetato quinasa de *Thermotoga maritima*
SEQ ID 21 Secuencia proteica de Piruvato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*
25 **SEQ ID 22** Secuencia proteica de Piruvato quinasa de *Sulfolobus solfataricus*
SEQ ID 23 Secuencia proteica de Piruvato quinasa de *Thermotoga maritima*
SEQ ID 24 Secuencia proteica de Piruvato quinasa de *Pyrococcus furiosus*
SEQ ID 25 Secuencia proteica de Acetato quinasa de *Methanosarcina thermophila*
SEQ ID 26 Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*
30 **SEQ ID 27** Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*, en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en *E.coli*.
SEQ ID 28 Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*
SEQ ID 29 Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*, en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en *E.coli*.
35 **SEQ ID 30** Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Archaeoglobus fulgidus*, en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en *E.coli*.
SEQ ID 31 Secuencia de ADN que codifica la Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*, en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en *E.coli*. (SEQ ID 27).
SEQ ID 32 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*, en la que el uso de codones se ha optimizado para la expresión del gen en *E.coli* (SEQ ID 29).
40 **SEQ ID 33** Secuencia proteica de sustrato de transglutaminasa.
SEQ ID 34 Secuencia proteica de Adenilato quinasa termoestable de *Sulfolobus acidocaldarius* fusionada en el extremo N-terminal con una secuencia del sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
SEQ ID 35 Secuencia proteica de Adenilato quinasa termoestable de *Sulfolobus acidocaldarius* fusionada en el extremo C-terminal con una secuencia del sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
45 **SEQ ID 36** Secuencia proteica de Adenilato quinasa termoestable de *Sulfolobus acidocaldarius* fusionada en el extremo N-terminal con una secuencia del sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)
SEQ ID 37 Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 5' de la Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.
50 **SEQ ID 38** Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo N terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
SEQ ID 39 Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 3' de Adenilato Quinasa de *Thermotoga maritima*.
SEQ ID 40 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo C terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
55 **SEQ ID 41** Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada a los extremos 5' y 3' de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.
SEQ ID 42 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada en el extremo N-terminal y C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).
60 **SEQ ID 43** Secuencia de ADN del constructo del gen de Sup35 completo de *Saccharomyces cerevisiae*

- SEQ ID 44** Secuencia proteica de Sup35 completo de *Saccharomyces cerevisiae*
SEQ ID 45 Secuencia de ADN de codones predispuestos de sup35N (dominio N-terminal) para la expresión óptima en *E. coli*
SEQ ID 46 Secuencia proteica de sup35N (dominio N-terminal)
5 **SEQ ID 47** Secuencia de ADN de Adenilato quinasa con codones predispuestos en *E.coli* de *Sulfolobus acidcaldarius* fusionada al extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae*
SEQ ID 48 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidcaldarius* fusionada en el extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae*
10 **SEQ ID 49** Secuencia de ADN de de Adenilato quinasa con codones predispuestos en *E.coli* de *Sulfolobus acidcaldarius* fusionada al extremo C-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae*
SEQ ID 50 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidcaldarius* fusionada en el extremo C-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae*
SEQ ID 51 Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 5' de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.
SEQ ID 52 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada en el extremo N-terminal
15 con Sup35N.
SEQ ID 53 Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 3' de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.
SEQ ID 54 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada en el extremo C-terminal con Sup35N
SEQ ID 55 Secuencia de ADN que codifica un péptido Sup35 corto capaz de agregarse para formar fibrilas de
20 amiloide; para utilizar como un péptido de fusión con genes de tAK.
SEQ ID 56 Péptido amiloide derivado de Sup35
SEQ ID 57 Secuencia de ADN que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)
SEQ ID 58 Secuencia proteica de la proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)
SEQ ID 59 Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)
25 optimizada para la expresión en *E.coli*
SEQ ID 60 Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en *E.coli* fusionada en el extremo 5' de un gen que codifica la tAK de *Thermotoga maritima*.
SEQ ID 61 Secuencia proteica de una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) fusionada en el extremo N-terminal de la Adenilato Quinasa de *Thermotoga maritima*.
30 **SEQ ID 62** Secuencia proteica de una proteína de cubierta de bacteriófago MS2
SEQ ID 63 Secuencia proteica de un monómero de proteína de cubierta de bacteriófago PP7
SEQ ID 64 Secuencia proteica de un dímero de proteína de cubierta de bacteriófago PP7
SEQ ID 65 Secuencia proteica de CsgA de *E.coli*
35 **SEQ ID 66** Secuencia proteica de AgfA de *Salmonella*
SEQ ID 67 Secuencia proteica de Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo N-terminal de CsgA de *E.coli*
SEQ ID 68 Secuencia proteica de la proteína hidrofobina 3 de la especie *Fusarium*
SEQ ID 69 Secuencia proteica de la proteína hidrofobina 5 de la especie *Fusarium*
40 **SEQ ID 70** Secuencia proteica de la proteína de tipo cemento de *Balanus albicostatus* (19K)
SEQ ID 71 Secuencia proteica de la proteína de tipo cemento de *Megabalanus rosa* (20k)
SEQ ID 72 Secuencia proteica de fusión de la proteína de percebe de *Balanus albicostatus* con la tAK de *Thermotoga maritima*; fusión N-terminal
SEQ ID 73 Secuencia proteica de fusión de la proteína de percebe de *Balanus albicostatus* con la tAK de
45 *Thermotoga maritima*; fusión C-terminal
SEQ ID 74 Secuencia proteica de adsorbente específico de calcita de *Balanus albicostatus*
SEQ ID 75 Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
SEQ ID 76 Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
SEQ ID 77 Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe
50

Ejemplo 1

Purificación de enzimas adenilato quinasa nativas

55 **[0141]** Se produjo biomasa de veinticuatro microorganismos termófilos e hipertermófilos diversos (Tabla 1).

[0142] Se representaron ocho miembros de las arqueas junto con dieciséis bacterias aeróbicas y anaeróbicas diversas. Se purificaron las AK de cada uno de estos organismos mediante cromatografía de afinidad utilizando absorción y desorción selectiva de Cibacron Blue 3A (Azul Sefarosa). Todas las enzimas se caracterizaron
60 adicionalmente y se purificaron mediante filtración en gel (Superdex G200). Esto permitió la identificación de la

fracción de AK principal y la estimación de la masa molecular.

Tabla 1: Lista de organismos termófilos cultivados para producir biomasa para el aislamiento de AK termoestables

5

Organismo	Dominio	Crecimiento	T _{opt}	pH _{opt}
1 Aeropyrum pernix	Arquea	Aerobio	95°C	7,0
2 Alicyclobacillus acidocaldarius	Bacteria	Aerobio	65°C	3,5
3 Aquifex pyrophilus	Bacteria	Microaerophi leeberophile	85°C	6,5
4 Bacillus caldotenax BT1	Bacteria	Aerobio	65°C	7,0
5 especie Bacillus PS3	Bacteria	Aerobio	65°C	7,0
6 Bacillus stearothermophilus 11057	Bacteria	Aerobio	65°C	7,0
7 Bacillus stearothermophilus 12001	Bacteria	Aerobio	65°C	7,0
8 Bacillus thermocatenulatus	Bacteria	Aerobio	65°C	7,0
9 Clostridium stercorarium	Bacteria	Anaerobio	55°C	7,0
10 Meiothermus ruber	Bacteria	Aerobio	60°C	6,5
11 Pyrococcus furiosus	Arquea	Anaerobio	95°C	7,5
12 Pyrococcus horikoshii	Arquea	Anaerobio	95°C	7,0
13 Pyrococcus woesei	Arquea	Anaerobio	95°C	7,0
14 Rhodothermus marinus	Bacteria	Aerobio	70°C	6,5
15 Sulfolobus acidocaldarius 98-3	Arquea	Aerobio	75°C	2,5
16 Sulfolobus shibatae B21	Arquea	Aerobio	75°C	2,5
17 Sulfolobus solfataricus P2	Arquea	Aerobio	75°C	2,5
18 Thermoanaerobacter ethanolicus	Bacteria	Anaerobio	65°C	6,0
19 Thermoanaerobacter thermosulfurogenes	Bacteria	Anaerobio	65°C	6,5
20 Thermobrachium celere	Bacteria	Anaerobio	60°C	7,0
21 Thermococcus litoralis	Arquea	Anaerobio	85°C	6,5
22 Thermus aquaticus YT1	Bacteria	Aerobio	70°C	8,0
23 Thermus caldophilus GK24	Bacteria	Aerobio	70°C	8,0
24 Thermus thermophilus HB8	Bacteria	Aerobio	70°C	8,0

Ejemplo 2

10

Análisis de la termoestabilidad de adenilato quinasas nativas

[0143] Se evaluó la termoestabilidad a 70, 80 y 90°C de adenilato quinasas aisladas de biomasa de organismos termófilos y los resultados se muestran en la figura 1.

15

[0144] Las adenilato quinasas se aislaron de la biomasa mediante cromatografía de afinidad utilizando absorción y desorción selectiva de Cibacron Blue 3A (Azul Sefarosa). Las muestras eluidas de las columnas se diluyeron 1:10000 y a continuación se añadieron 10 ml de cada una a un pocillo de microtitulación. Se añadieron 2,5 µl de apirasa a cada pocillo para destruir el ATP presente del tampón de elución, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. La apirasa se desactivó mediante tratamiento térmico a 65°C durante 20 minutos.

20

[0145] Se añadió sustrato ADP y se incubó a 70°C (panel A), 80°C (panel B) o 90°C (panel C) durante 30 minutos y se enfrió hasta 25°C antes de la adición de 10 µl de reactivo D-luciferin-luciferasa. El ATP producido se midió como 5 RLU en un luminómetro de placa.

Ejemplo 3

Expresión y purificación de adenilato quinasa recombinantes.

10

[0146] Se protegieron los clones que expresaban AK termoestables representativas y se produjeron AK termoestables recombinantes de la arquea termoacidófila *Sulfolobus acidocaldarius* y la bacteria termófila, *Bacillus stearothermophilus*. Los plásmidos se transformaron en *E.coli* y se observó que los extractos celulares contenían bandas de proteínas en electroforesis correspondientes a las masas moleculares esperadas de las AK. La actividad de AK termoestable se midió después de la incubación a la temperatura apropiada (80°C para la AK de *Sulfolobus acidocaldarius* y 60°C para la AK de *Bacillus stearothermophilus*).

15

[0147] Se establecieron métodos de purificación para ambas AK termoestables e incluían un tratamiento térmico inicial de incubación durante 20 minutos a 80°C, para desactivar y agregar proteínas derivadas de *E.coli*, seguido de cromatografía de afinidad y filtración en gel. La cromatografía de afinidad implicaba la adsorción de la enzima a Azul Sefarosa, seguido de una elución específica con una concentración baja de cofactores de AK (AMP+ATP e iones magnesio). El ATP y AMP (Sigma) en el tampón de elución se degradaron mediante incubación con apirasa mesófila que se desactiva fácilmente mediante el tratamiento posterior con calor. La cromatografía de filtración en gel se escaló para utilizar una columna Superdex de grado preparativo que permite la preparación de cantidades grandes de ambas enzimas.

20

25

[0148] Los cebadores se diseñaron para la amplificación mediante PCR de los genes de AK de los organismos termófilos identificados durante la selección de enzimas nativas candidatas.

30

[0149] Los microorganismos termoestables se desarrollaron usando condiciones de crecimiento definidas individualmente y se aisló y utilizó el ADN genómico como molde para la amplificación mediante PCR de los genes de adenilato quinasa de cada organismo. Los genes de adenilato quinasa amplificados por PCR de los organismos termófilos, *Thermotoga maritima*, *Aeropyrum pernix*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus* se subclonaron en el vector pET28a y se transformaron en una cepa de *E. coli* potenciada en codones que expresaba ARNt raros (Zdanovsky et al., 2000). Esta cepa de *E. coli* es adecuada para aumentar los niveles de expresión de los genes ricos en AT.

35

40

[0150] El éxito de la transformación se evaluó mediante un estudio de miniexpresión y los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo antes y después de la inducción con IPTG. El SDS-PAGE también se usó para analizar los sobrenadantes tras la inclusión de una etapa de tratamiento con calor, que consistía en calentar la muestra a 80°C durante 20 minutos antes de desarrollar el gel de SDS-PAGE para eliminar las proteínas lábiles al calor presentes en la muestra.

Secuencias:

45

[0151]

SEQ ID No.1 - Adenilato quinasa de *Sulfolobus solfataricus*

50

MKIGIVTGIP GVGKTTVLSF ADKILTEKGI SHKIVNYGDY MLNTALKEGY VKSRDEIRKL QIEKQRELQA
LAARRIVEDL SLLGDEGIGL IDTHAVIRTP AGYLPGLPRH VIEVLSPKVI FLLEADPKII LERQKRDSSR
ARTDYSDTAV INEVIQFARY SAMASAVLVG ASVKVWNQE GDPSIAASEI INSLM

SEQ ID No. 2 - Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius*

55

MKIGIVTGIP GVGKSTVLAK VKEILDNQGI NNKIINYGDF MLATALKLG Y AKDRDEMRLK SVEKQKLLQI
DAAKGIAEEA RAGGEGYLF I DTHAVIRTPS GYLPGLPSYV ITEINPSVIF LLEADPKIIL SRQKRDTRN
RNDYSDESVI LETINFARYA ATASAVLAGS TVKVIVNVEG DPSIAANEII RSMK

60

SEQ ID No. 3 - Adenilato quinasa de *Sulfolobus tokodaii*

MSKMKIGIVT GIPGVGKTTV LSKVKEILEE KKINNKIVNY GDYMLMTAMK LGYVNNRDEM RKLPEKQKQ
LQIEAARGIA NEAKEGGDGL LFIDTHAVIR TPSGYLPLG KYVIEEINPR VIFLLEADPK VILDRQKRDT
SRSRSDYSDE RISETINFA RYAAMASAVL VGATVKIVIN VEGDPAVAAN EIINSML

5

SEQ ID No. 4 - Adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus*

MPFWIITGI PGVGKSTITR LALQRTKAKF RLINFGDLMF EEAVKAGLVK HRDEMRKLPL KIQRELQMK
AKKITEMAKE HPILVDTHAT IKTPHGYMLG LPYEWKTLN PNFIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET
10 EEQIQRHQDL NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVNEYA

SEQ ID No. 5 - Adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*

MPFWIITGI PGVGKSTITK LALQRTRAKF KLINFGDLMF EEALKLKLK HRDEMRKLPL EVQRELQMN
15 AKKIAEMAKN YPILLDTHAT IKTPHGYLLG LPYEVIKILN PNFIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET EEQIQRHQDL
NRAAAITYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVKEYA

SEQ ID No. 6 - Adenilato quinasa de *Pyrococcus abyssi*

20 MSFVVIITGI PGVGKSTITR LALQRTKAKF KLINFGDLMF EEAVKAGLVN HRDEMRKLPL EIQRDLQMKV
AKKISEMARQ QPILLDTHAT IKTPHGYLLG LPYEVIKTLN PNFIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET
EEQIQRHQDL NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVEILD AVKEYA

SEQ ID No. 7 - Adenilato quinasa de *Methanococcus thermolithotrophicus*

25

MKNKLVVVTG VPGVGGTTIT QKAMEKLSEE GINYKVMVNF TVMFEVAQEE NLVEDRDQMR KLDPDTQKRI
QKLAGRKIAE MVKESPVVVD THSTIKTPKG YLPGPLVWVL NELNPDIIIV VETSGDEILI RRLNDETRNR
DLETTAGIEE HQIMNRAAM TYGVLTGATV KIIQNKNNLL DYAVEELISV LR

30 SEQ ID No. 8 - Adenilato quinasa de *Methanococcus voltae*

MKNKVVVVTG VPGVGSTTSS QLAMDNRKE GVNYKMVSFG SVMFEVAKEE NLVSDRDQMR KMDPETQKRI
QKMAGRKIAE MAKESPVAVD THSTVSTPKG YLPGPLSWVL NELNPDIIIV VETTGDEILM RRMSDETRVR
DLDTASTIEQ HQFMNRCAAM SYGVLTGATV KIVQNRNGLL DQAVEELTNV LR

35

SEQ ID No. 9 - Adenilato quinasa de *Methanococcus jannaschii*

MMMMKKNKVVV IVGVPGVGST TVTNKAIEEL KKEGIEYKIV NFGTVMFEIA KEEGLVEHRD QLRKLPPEEQ
KRIQKLAGKK IAEMAKEFNI VVDTHSTIKT PKGYLPLPA WVLEELNPD IVLVEAENDE ILMRRLKDET
40 RQRDFESTED IGEHIFMNRC AAMTYAVLTG ATVKIKNRD FLLDKAVQEL IEVLK

SEQ ID No. 10 - Adenilato quinasa de *Methanopyrus kandleri*

MGYVIVATGV PGVGATTVTT EAVKELEGYE HVNYGDVMLE IAKEEGLVEH RDEIRKLPAE KQREIQLAA
45 RRIAKMAEEK EGIIVDTHCT IKTPAGYLP LPIWVLEELQ PDVIVLIEAD PDEIMMRRVK DSEERQRD
RAHEIEEHQK MNRMAAMAYA ALTGATVKII ENHDDRLEEA VREFVETVRS L

SEQ ID No. 11 - Adenilato quinasa de *Methanoterris igneus*

50 MKNKVVVVTG VPGVGGTTLT QKTIEKLKEE GIEYKVMVNF TVMFEVAKEE GLVEDRDQMR KLDPDTQKRI
QKLAGRKIAE MAKESNVIVD THSTVKTPKG YLAGLPIWVL EELNPDIIIV VETSSDEILM RRLGDATRNR
DIELTSIDIDE HQFMNRCAAM AYGVLGTGATV KIIKNRDGLL DKAVEELISV LK

SEQ ID No. 12 - Adenilato quinasa de *Pyrobaculum aerophilum*

55

MKIVIVALPG SGKTTILNFV KQKLPDVKIV NYGDVMLEIA KKRFGIQHRD EMRKKIPVDE YRKVQEEAAE
YIASLTGDVI IDTHASIKIG GGYYPGLPDR IISKLKPDVI LLEYPDVI LERRKKDPDR FRDLESEEEI
EMHQANRY YAFAAANAGES TVHVLNFRGK PESRPFHAEE VAAEYIVNLI LRTRQKS

60 SEQ ID No. 13 - Adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*

MMAYLVLGPG PGAGKGTYAK RIQEKTGIPH ISTGDIFRDI VKKENDELGK KIKEIMEKGE LVPDELVNEV
 VKRRLSEKDC EKGFIELDGYP RTVAQAEFLD SFLESQNKQL TAAVLFDVPE DVVVQRLTSR RICPKCGRIY
 NMISLPPKED ELCDDCKVKL VQRDDDKKEET VRHRYKVYLE KTQPVIDYYG KKGILKRVDG TIGIDNVVAE
 5 VLKIIGWSDK

SEQ ID No. 14- Adenilato quinasa de *Aeropyrum pernix*

MKVRHPFKW VVTGVPVGVK TTVIKELQGL AEKEGVKLHI VNFSGFMLDT AVKLGLVEDR DKIRTLPLRR
 10 QLELQREAAK RIVAEASKAL GGDGVLIIDT HALVKTAVGY WPGLPKHVLD ELKPDMAVV EASPEEVAAR
 QARDTTRYRV DIGGVEGVKR LMENARAASI ASAIQYASTV AIVENREGEA AKAAEELLRL IKNL

SEQ ID No. 15- Adenilato quinasa de *Archaeoglobus fulgidus*

15 MNLIFLGPPG AGKGTQAKRV SEKYGIPQIS TGDMLREAVA KGTELGKKAK EYMDKGELVP DEVVIGIVKE
 RLQPPDCEKG FILDGFPRTL AQAALDEML KELNKKIDAV INVVVPEEEV VKRITYRRTC RNCGAVYHLI
 YAPPKEDNKC DKCGGELYQR DDKEETVRE RYRVYKQNTD PLIDYYRKKG ILYDVDGTDK IEGVWKEIEA ILEKIKS

SEQ ID No. 16- Adenilato quinasa monomérica (AdkE) de *Pyrococcus abyssi*

20 MNILIFGPPG SGKSTQARRI TERYGLTYIA SGDIIRAEIK ARTPLGIEME RYLSRGDLIP DTIVNTLIIS KLRVRENFI
 MDGYPRTPAQ VITLENLYLD HGIKLDVAID IYITKEESVR RISGRRICKS CGAVYHVEFN PPKVPGKCDI
 CGGELIQRPD DRPEIVEKRY DIYSKNMEPI IKFYKQGGIY VRIDGHGSID EVWERIRPLL DYIYNQENRR

25 Ejemplo 4

Análisis de la termoestabilidad de las adenilato quinasa recombinantes

[0152] La estabilidad térmica de las enzimas AKt recombinantes se evaluó en lisados celulares de *E. coli* sin
 30 procesar.

[0153] Las células se desarrollaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 y se lisaron por sonicación. La
 actividad AK del extracto sin procesar se determinó tanto antes como después del tratamiento con calor a 80°C
 durante 30 minutos, seguido de una dilución en serie 1:10.
 35

[0154] Los resultados (véase la Figura 2) muestran que una amplia variedad de enzimas recombinantes son
 adecuadas para el uso en el método de la invención. En una realización, las AK son las de *T. maritima*, *A. fulgidus* y
S. solfataricus. Es probable que estas enzimas proporcionen un intervalo dinámico mayor para el ensayo
 bioluminiscente, si es necesario, para proporcionar aún más sensibilidad.
 40

Ejemplo 5

Modificación genética de las adenilato quinasa para mejorar la estabilidad

45 [0155] Se construyeron mutantes dirigidos de sitio en el gen AK de *P. furiosus*, *P. horikoshii* y *S. acidocaldarius*
 como se muestra en los Ejemplos 6-8 y en las SEQ ID N° 17-19 respectivamente, usando métodos estándar
 conocidos por los expertos en la materia.

[0156] Además de los cambios específicos identificados en cada gen, las regiones subrayadas en la secuencia de *S.*
acidocaldarius forman la región de empaquetamiento del núcleo de la estructura trimérica de la adenilato quinasa de
 arqueas. Por tanto, es probable que las sustituciones de aminoácidos que alteran el empaquetamiento de esta
 región tengan un efecto mayor en la disminución de la estabilidad térmica y física de la enzima. Por el contrario, las
 sustituciones de aminoácidos que mejoran el empaquetamiento del núcleo, especialmente residuos hidrófobos con
 cadenas laterales grandes, pueden estabilizar la enzima ante los procesos térmicos u de otro tipo. Por tanto,
 55 además de las mutaciones específicas ya descritas, se utilizaron diversas estrategias "selectivas" con la mezcla de
 genes localizados de secuencias génicas relacionadas en estas regiones (esencialmente como se describe en
 Stemmer (1994) Nature 370:389-391 y Cramer et al. (1996) Nature Biotech. 14:315-319) y mutagénesis aleatoria
 basada en PCR usando oligonucleótidos degenerados o mezclas de nucleótidos modificados (por ejemplo,
 Vartanian et al. (1996) Nucleic Acid Res. 24:2627-2633). Algunas de estas modificaciones muestran una estabilidad

alterada cuando se evalúan mediante expresión recombinante en *E. coli* y un ensayo rápido de la actividad adenilato quinasa en células lisadas a alta temperatura.

Ejemplo 6

5

Adenilato quinasa de *Pyrococcus furiosus* modificada genéticamente para proporcionar una estabilidad mejorada (SEQ ID NO. 17).

10 **[0157]** MPFVVIITGI PGVKGSTITR LALQRTKAKF RLINFGDLMF EEAVKAGLVK HRDEMRLPL (**K A E**)
IQRELQMKA AKKI (**T A A**) EMAKE HPILVDTHAT IKTPHGY (**M A L**) LG LPYEVVKTLLN PNFIVIEAT PSEILGRRLR
DLKRDRDVET EEQQRHQDL NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVNEYA

15 **[0158]** Las mutaciones en uno o más o todos los sitios indicados modifican la termoestabilidad de la enzima. Además de los tres cambios definidos destacados, la modificación de la alanina en la posición 157 por otro residuo hidrófobo pequeño (tal como I o L) o un residuo hidrófobo más grande (tal como F) aumenta la termoestabilidad de la proteína recombinante. Por tanto, hay 35 variantes posibles a través de la combinación de modificaciones en estos sitios. La modificación del aminoácido 157 por un residuo polar, tal como la T (como se observa en la posición equivalente en la AdKA de *P. horihoshii*), S, Y, D, E, K, R da lugar a una disminución de la estabilidad.

20 Ejemplo 7

Adenilato quinasa de *Pyrococcus horikoshii* modificadas genéticamente para proporcionar una estabilidad mejorada (SEQ ID NO. 18).

25 **[0159]** La modificación de alguno o ambos residuos mostrados en negrita y subrayados incrementa la estabilidad térmica de la enzima (son posibles 3 variantes).

30 **[0160]** MPFVVIITGI PGVKGSTITK LALQRTRAKF KLINFGDLMF EEALKLGLVK HRDEMRLPL EVQRELQMNA
AKKIAEMAKN YPILLDTHAT IKTPHGYLLG LPYEVIKILN PNFIVIEAT PSEILGRRLR DLKRDRDVET EEQQRHQDL
NRAAAIAYAM HSNALIKIIE NHEDKGLEEA VNELVKILDL AVKEYA

Ejemplo 8

35 **Adenilato quinasa de *Sulfolobus acidocaldarius* modificada genéticamente para proporcionar una estabilidad mejorada (SEQ ID NO. 19).**

[0161] La modificación de los residuos subrayados mostrados puede incrementar la estabilidad térmica de la enzima.

40 **[0162]** MKIGIVTGIP GVGKSTVLAK VKEILDNQGI NNKIINYGDF MLATALKLG Y AKDRDEMRLK SVEKQKKLQI
DAAKGIAEEA RAGGEGYLF DTHAVIRTPS GY (A A M) PGLPSYV ITEINPSVIF LLEADPKIIL SRQKRDTTRN
RNDYSDESVI LETINFARYA ATASAVLAGS TVKVIVNVEG DPSIAANEII RSMK

Ejemplo 9

45

Expresión de acetato y piruvato quinasa

[0163] Después de los métodos del ejemplo 3, se expresaron las acetato y piruvato quinasa:

50 SEQ ID No. 20 - Acetato quinasa de *Thermatoga maritima*

MRVLVINS GS SSIKYQLIEM EGEKVLC KGI AERIGIEGSR LVHRVGDEKH VIERELPDHE EALKLILNTL
VDEKLGVIKD LKEIDAVGHR VVHGGERFKE SVLVDEEV LK AIEEV SPLAP LHN PANLMGI KAAMKLLPGV
PNVAVFD TAF HQTIPQKAYL YAIPY EY EK YKIRRYGFHG TSHRYVSKRA AEILGKKLEE LKIITCHIGN
55 GASVA AVKYG KCVDTSMGFT PLEGLVMGTR S GDLDP AIPF FIMEKEGISP QEMYDILNKK SGVYGLSKGF
SSDMRDIEEA ALKGDEWCKL VLEIYDYRIA KYIGAYAAAM NGVDAIVFTA GVGENSPITR EDVCSYLEFL
GVKLDKQKNE ETIRGKEGII STPDSRVKVL VVPTNEELMI ARDTKEIVEK IGR

SEQ ID No. 21 - Piruvato quinasa de *Pyrococcus horikoshii*

60

MRRMKLPSHK TKIVATIGPA TNSKKMIKKL IEAGMNVARI NFSHGTFEEH AKIEMVREQ SQKLDRRVAI
 LADLPGLKIR VGEIKGGYVE LERGEKVTLT TKDIEGDETT IPVEYKDFPK LVSKGDVIYL SDGYIVLRVE
 DVKENEVEAV VISGGKLSFR KGINIPKAYL PVEAITPRDI EIMKFAIEHG VDAIGLSFVG NVYDVLKAKS
 FLERNAGGDT FVIKIERPD AVRNFNEILN AADGIMIARG DLGVEMPIEQ LPILQKRLIR KANMEGKPMI
 5 TATQMLVSMT MEKVPTRAEV TDVANAILDG TDAVMLSEET AVGKFPFIEAV EMMARIAKVT EYRESFGIT
 RMREFLEGTK RGTIKEAITR SIIDAICTIG IKFILTPTKT GRTARLISRF KPKQWILAFS TREKVCNNLM
 FSYGVYPCFM EEGFNENDIV RLIKGLGLVG SDDIVLMTEG KPIEKTGVTN SIKIFQIA

SEQ ID No. 22 - Piruvato quinasa de *Sulfolobus solfataricus*

10 MRKTKIVATL GPSSEEKVKELAEYVDVFRI NFAHGDETSRKYFDLIRTY APESIIIVDL PGPKLRLGEL
 KEPIEVKKGD KIVFSQKDI PVDDELFSY VKNESDILIA DGIRVRVKS KAKDRVEGTV IEGGILLSRK
 GINIPNVNLK SGITDNDLKLKRALDLGAD YIGLSFVISE NDVKKVKEFV GDEAWVIAKI EKSEALKNLT
 NIVNESDGM VARGDLGVET GLENLPLIQR RIVRTSRVFG KPVILATQVL TSMINSPIPT RAEIIDSNS
 15 IMQGVDSIML SDETAIGNYP VESVRTLHNI ISNVEKSVKH RPIGPLNSES DAIALAAVNA SKVSKADVIV
 VYSRSGNSIL RVSRLRPERN IIGVSPDPRLLAKFKLCYGV IPISINKKMQ SIDEIIDVSA KLMQEKIKDL KFKKIVIVGG
 DPKQEAGKTN FVIVKTLEQQ KK

SEQ ID No. 23 - Piruvato quinasa de *Thermotoga maritima*

20 MRSTKIVCTV GPRTDSYEMI EKIDMLGVNV FRINTSHGDW NEQEQKILKI KDLREKPKP VAILIDLAP
 KIRTYLEKE FVELKEGQIF TLTTKEILGN EHIVSVNLSS LPKDVKKGD ILLSDGEIVL EVIETDTEV KTVVKGKGI
 THRRGVNVPT ADLSVESITD RDEFIKLGT LHDVEFFALS FVRKPEDVLK AKKEIRKHGK EIPVSKIET
 KKALERLEEI IKVSDGIMVA RGDVGVEIPI EEPVIVQKEI IKLSKYYSKP VIVATQILES MIENPFPTRA EVDIANAI
 25 DGADALLTA ETAVGKHPLA IKVLSKVAK EAEKKLEFFR TIEYDTSIS EAISHACWQL SESLNAKLI
 TPTISGSTAV RVSKYVNSQP IVALTPEEKT YYRLSLVRKV IPVLAEKCSQ ELEFIEKGLK KVEEMGLAEK
 GDLWLTSGV PGKVGTTNTI RVLKVD

SEQ ID No. 24 - Piruvato quinasa de *Pyrococcus furiosus*

30 MRRVKLPSHK TKIVATIGPA TNSRKMIIKQL IKAGMNVARI NFSHGSFEEH ARVIEIREE AQKLDRRVAI
 LADLPGLKIR VGEIKGGYVE LKRGEKVILT TKDVEGDETT IPVDYKGFNP LVSKGDIYLL NDGYIVLKVE
 NVRENEVEAV VLSGGKLSFR KGVNIPKAYL PVEAITPKDF EIMKFAIEHG VDAIGLSFVG SVYDVLKAKS
 FLEKNAEDV FVIKIERPD AVRNFDEILN AADGIMIARG DLGVEMPIEQ LPILQKRLIR KANMEGKPMI
 35 TATQMLVSMT TEKVPTRAEV TDVANAILDG TDAVMLSEET AIGKFPFIEAV EMMGKIAKVT EYRESFGIS
 RIREFMEIKK GTIKEAITRS IIDAICTIDI KFILTPTRTG RTARLISRFK PKQWILAFST NERVCCNNLMF SYGVYPCLE
 EGFDENDIVR LKGLGLVES DDMVLMTEGK PIEKTVGTNS IKIFQIA

SEQ ID No. 25 - Acetato quinasa de *Methanosarcina thermophila*

40 MKVLVINAGS SSLKYQLIDM TNESALAVGL CERIGIDNSI ITQKKFDGKK LEKLTDLPTH KDALEEVVKA
 LTDDEFGVIK DMGEINAVGH RVVHGGEKFT TSALYDEGVE KAIKDCFELA PLHNPPNMMG ISACAEIMPG
 TPMVIVFDTA FHQTMPPYAY MYALPYDLYE KHGVRKYGFH GTSHKYVAER AALMLGKPAE ETKIITCHLG
 NGSSITAVEG GKSIVTSMGF TPLEGLAMGT RCGSIDPAIV PFLMEKEGLT TREIDTLMNK KSGVLGVSGL
 45 SNDFRDLEA ASKGNRKAEL ALEIFAYKVK KFIGEYSAVL NGADAWFTA GIGENSASIR KRILTGLDGI
 GIKIDDEKNK IRGQEIDIST PDAKVRVFI PTNEELAIAR ETKEIVETEV KLRSSIPV

Ejemplo 10

50 Preparación de un dispositivo indicador basado en fibrina

Preparación de fusiones de tAK para la reticulación a fibrina

[0164] Se añade una secuencia de sustrato de transglutaminasa (MNQEQVSPLGG - SEQ ID No: 33) en el extremo
 55 N-terminal, el extremo C-terminal o ambos extremos N y C terminal de la Adenilato quinasa termoestable de *S.*
acidocaldarius codificada por un clon de gen de codones optimizados. (La secuencia de sustrato de
 transglutaminasa se refiere indistintamente en estos ejemplos como fibrina, péptido de fibrina o el sustrato de
 transglutaminasa). Esta construcción se transfiere como un fragmento Ndel - Sall en el vector de expresión interno
 (pMTL 1015; tal como se describe en WO 2005/123764). La construcción de expresión se confirma mediante
 60 secuenciación de ADN y se transfiere en los huéspedes de expresión BL21 o RV308 para la expresión posterior.

[0165] De manera similar, el gen de tAK resintetizado de *Thermatoga maritima* (SEQ ID 29) se fusiona a la secuencia de transglutaminasa en las tres orientaciones identificadas anteriormente. La clonación y preparación del sistema de expresión es también como se ha descrito anteriormente. Las construcciones de fusión también se pueden expresar en otras combinaciones de vector de expresión-huésped con la adición de etiquetas de afinidad para la posterior purificación. Son particularmente útiles en este contexto vectores de expresión que añaden etiquetas de 6 histidinas en el extremo N o C terminal de las proteínas de fusión, modificaciones que ayudan en la purificación y detección, pero no interfieren con las propiedades intrínsecas de las proteínas de fusión. Los vectores para este tipo de modificación incluyen vectores de la serie pET (Novagen / Merck) y vectores de la serie pQE (Qiagen).

[0166] Para generar material para los dispositivos indicadores, se desarrollan cepas de expresión inicialmente en fermentadores de 8 litros esencialmente bajo condiciones de cultivo estáticas. Brevemente, las cepas se preparan como lotes de semillas y posteriormente se diluyen en los 8 litros de medio de crecimiento (caldo modificado de manera importante que contenía glucosa adicional). Los cultivos se desarrollan bajo condiciones de fermentación estándar hasta que los cultivos alcanzan una densidad óptima (DO a 600 nm) que demuestra que están entrando en condiciones estacionarias (habitualmente alrededor de DO = 5). A continuación, los fermentadores se mantienen bajo condiciones mínimamente aireadas durante hasta 12 horas antes de recoger el material mediante centrifugación continua.

20

Purificación de fusiones de tAK

[0167] A continuación, el material recogido se purifica según el siguiente protocolo.

25 **Tampón A:** 20 mM Tris-HCl 900 mM NaCl, pH 7.5

Tampón de lavado: 20 mM Tris-HCl 200 mM NaCl, pH 7,5

Tampón B: 20 mM Tris-HCl 200 mM NaCl, pH 7,5 10 mM ATP 10 mM AMP 10 mM MgCl₂

Tampón de MgAc: 15 mM MgAc (1 M Fluka BioChemika), pH 6.8

- 30 1. Pesar la pasta celular congelada (10 g) y resuspender en 3 veces (30 ml) el volumen del Tampón A, pH 7,5.
2. Sonicar en hielo (~12.000khz) utilizando 25 ciclos de 30 segundos conectado/30 segundos desconectado. Tomar 1 ml de muestra.
3. Se centrifuga la solución celular sonicada a 6.000rpm durante 30 min a 4 grados centígrados. El sobrenadante se vierte cuidadosamente y se toma 1 ml de muestra.
- 35 4. El sobrenadante se trata con calor a 80 grados centígrados en un baño de agua durante 20 min. Se toma una muestra de 1 ml. (Esta etapa es una etapa opcional dependiendo de la estabilidad térmica de las proteínas de fusión).
5. La solución tratada con calor se centrifuga a 6000 rpm durante 30 min a 4 grados centígrados. Se vierte el sobrenadante y se toma 1 ml de muestra.
- 40 6. Filtrar la muestra con un filtro de baja unión de 0,2 µm antes de cargar en la columna,
7. Equilibrar la columna de flujo rápido de azul sefarosa con 5 volúmenes de columna (CV) de tampón A.
8. Cargar la muestra. Lavar la columna con tampón de lavado a 0,2 ml/min durante la noche.
9. Eluir la proteína con tampón B al 100% a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Recoger el producto en fracciones de 2,5 ml.
- 45 10. Una vez se han eluido todas las proteínas, lavar la columna con tampón B al 100% a 5 ml/min durante 5 CV.
11. Reequilibrar la columna con 5 CV de tampón A.
12. Enjuagar la columna con 5 CV de etanol al 120% para el almacenamiento a 4°C.

[0168] Opcionalmente, se aplican métodos adicionales de purificación de proteínas para producir un producto de pureza más elevada. La cromatografía de intercambio iónico en resinas de flujo rápido de SP-sefarosa o de flujo rápido de Q-Sefarosa es particularmente eficaz.

[0169] A continuación, las muestras se analizan utilizando un formato de ensayo estándar para identificar fracciones que contienen una actividad máxima de adenilato quinasa. Ésta se confirmó mediante un análisis SDS-PAGE utilizando técnicas estándar (véase la figura 3). Brevemente, el ensayo se lleva a cabo utilizando el siguiente protocolo:

1. Diluir la fusión de tAK purificada 1:1000 y 1:10,000 en tampón de MgAc. Añadir 100 µl por pocillo.
2. Tratar con Apirasa (50 µl/pocillo a 2,5 unidades por ml de concentración de solución madre; Apirasa de Grado VI Sigma de patata) e incubar durante 30 min a 30°C, con agitación, para extraer el ATP.

50

3. Incubar la placa a 70°C durante 10 min para desnaturalizar la Apirasa.
 4. Añadir 50 µl/pocillo de ADP (275 µM ADP en tampón de MgAc) y sellar. Incubar a 70°C durante 20 min.
 5. Extraer la placa y dejar enfriar hasta temperatura ambiente durante 20 min, calentar el reactivo de Luciferasa/Luciferina (L/L) hasta temperatura ambiente durante 20 min.
 6. Añadir 200 µl de ATP estándar a 1 ó 2 pocillos vacíos por placa.
 7. Colocar inyectores en el luminómetro y prepararlos con reactivo L/L (reactivo ATP, Biotherma). Inyectar 30 µl de reactivo L/L/pocillo.
 8. Leer la luz generada inmediatamente utilizando el luminómetro.
- 10 **[0170]** A continuación, las fracciones con actividad máxima de quinasa se dializan ampliamente frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS pH 7,4) y se almacenan hasta que es necesario. La confirmación de la presencia de la secuencia de sustrato de transglutaminasa añadida (es decir, el péptido de fibrina) en la tAK purificada se confirma mediante análisis de espectroscopía de masas SELDI (véase la figura 4).
- 15 **[0171]** Opcionalmente, se puede preparar una fusión entre la tAK y la molécula de fibrinógeno de longitud completa para proporcionar medios adicionales para incorporar la actividad enzimática en la película de fibrina.

Deposición de fusiones de tAK sobre un soporte sólido

- 20 **[0172]** La fusión tAK-fibrina se diluye hasta alrededor de 200 µg/ml en PBS o tampón bicarbonato (pH 9,6) y se aplica a un soporte sólido de acero inoxidable de grado 316L, plástico, vidrio o tejido. La proteína se deja adherir a la superficie hasta 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.
- [0173]** Opcionalmente, en esta etapa se añaden moléculas portadoras adicionales, por ejemplo, sacarosa a concentraciones de hasta el 1% p/v, albúmina hasta 1 mg/ml, mucina de cerdo hasta 0,5% p/v. La adición de dichos portadores puede ser particularmente importante para ciertos tipos de indicador, pero la presencia del portador no debe interferir con la posterior interacción y reticulación a la película de fibrina aplicada en la siguiente etapa.

Recubrimiento de muestra contaminada que contiene fibrina y reticulación a la fusión de fibrina-tAK

- 30 **[0174]** A continuación, se recubre muestra contaminada de muestra (matriz biológica) con la preparación de fusión de tAK-fibrina adherida sobre la superficie tal como se describe anteriormente.
- [0175]** Se añade una solución que contiene fibrinógeno para realizar la reticulación del indicador a la muestra contaminada de análisis que contiene fibrina.
- 40 **[0176]** Se mezcla de nuevo una solución que contenía de hasta 3 mg/ml de fibrinógeno (que contenía el Factor XIII), CaCl₂ 2,5 mM y trombina (hasta 5 unidades NIH por ml) y se añade a la superficie recubierta del soporte sólido. La reacción se deja proceder a temperatura ambiente hasta 30 minutos, dependiendo del nivel de reticulación requerido. Opcionalmente, en esta etapa se añaden albúmina (hasta 80 mg/ml) y hemoglobina (hasta 80 mg/ml) para proporcionar una estimulación más dura y más realista para la limpieza de una muestra contaminada de tipo sanguíneo. Después de la reticulación, se extrae el líquido residual y se dejar secar el dispositivo del indicador.
- 45 **[0177]** La figura 9 muestra un análisis SDS-PAGE de la unión covalente de una proteína de fusión tAK-fibrina con fibrinógeno para formar una película de tAK-fibrina.

- [0178]** Opcionalmente, se añade la fusión de tAK-péptido de fibrina a la solución de muestra contaminada de análisis que contiene fibrina (matriz biológica) antes de su adición a la superficie de soporte sólido. La reticulación del péptido de fibrina a la matriz se puede incrementar mediante la adición de más Factor XIII y/o la extensión de la duración de la reacción. La reticulación también se puede aumentar mediante la utilización de la proteína de fusión de tAK con péptidos de fibrina añadidos en ambos extremos de la molécula.

- [0179]** Opcionalmente, se podría añadir directamente una fusión de fibrinógeno-tAK a esta solución para proporcionar una reticulación adicional del indicador.

Reticulación química covalente de tAK a fibrina o fibrinógeno.

- [0180]** La preparación de tAK-fibrina como una proteína de fusión ya se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la tAK-fibrina también se puede preparar mediante la unión química de tAK a fibrina, péptidos de fibrina o fibrinógeno mediante una amplia gama de métodos familiares para los expertos en el campo. Por ejemplo, las preparaciones de

proteína purificada para fibrinógeno o fibrina se obtienen de fuentes comerciales (por ejemplo Sigma). La tAK de *S.acidocaldarius* se prepara tal como se ha descrito anteriormente. La tAK se deriva utilizando el reactivo que reacciona con amida SPDP (SPDP (*N*-Succinimidil 3-(2-piridilditio)-propionato; compañía química Pierce) según las instrucciones del fabricante. La fibrina o fibrinógeno también se deriva utilizando el mismo protocolo. La tAK derivatizada se reduce mediante la reacción con mercaptoetanol para producir un grupo sulfhidrilo reactivo. A continuación, éste se mezcla con la fibrina derivatizada con SPDP provocando la formación de enlaces covalentes entre las dos moléculas. Las concentraciones de los ayudantes de reacción deben determinarse empíricamente siguiendo las directrices en las instrucciones del fabricante para SPDP.

- 10 **[0181]** La tAK-fibrina o fibrinógeno unidos químicamente se puede utilizar indistintamente o adicionalmente a la proteína de fusión a lo largo de la descripción anterior de éste y los ejemplos posteriores.

Ejemplo 11

15 Utilizaciones de indicadores de fibrina-tAK

Utilización en un equipo de lavado y desinfección

[0182] Se prepara un indicador tal como se describe en el ejemplo 10. El soporte sólido es una tira de acero inoxidable rectangular de 55 mm x 5 mm x 0,75 mm, que puede estar recubierto en una o ambas superficies. Se colocan una o varias tiras indicadoras en la cámara del equipo de lavado y desinfección. De manera óptima, éstas se pueden colocar en sitios que pueden ser más difíciles de limpiar, proporcionando el grado más elevado de certeza de que el proceso de lavado ha sido eficaz. Alternativamente, se pueden colocar para monitorizar la función de múltiples brazos pulverizadores (es decir, donde éstos pueden ser independientes entre sí). Las tiras indicadoras se agarran a las estanterías u otra subestructura de la cámara del equipo de lavado y desinfección para asegurar que no se muevan durante el tratamiento de lavado. La orientación de los dispositivos sustitutos se puede modificar para proporcionar información adicional sobre la eficacia del proceso de lavado, por ejemplo, mediante su colocación de manera que la superficie recubierta está en los ángulos rectos a la dirección de la pulverización con agua.

30 **[0183]** Se añade la carga del instrumento y se realiza el ciclo de desarrollo estándar del proceso. Al final del desarrollo del proceso, se extraen los dispositivos de la cámara y se valora la presencia de fusión a tAK residual, tal como se indica en el ejemplo 12, antes de la extracción de los instrumentos y cualquier etapa de procesado. Opcionalmente, se pueden extraer los dispositivos durante el proceso de lavado mediante la interrupción del proceso en puntos definidos cuidadosamente o mediante la utilización de una máquina que proporciona un método de extracción del indicador durante el desarrollo del proceso.

Utilización en el procedimiento de análisis con endoscopios

40 **[0184]** El dispositivo indicador para monitorizar un sistema de reprocesado con endoscopio es esencialmente similar al indicado anteriormente. Se coloca en una cámara tubular una superficie de indicador de tamaño similar, representativa de cualquiera de los componentes de acero inoxidable en el endoscopio, el conducto de PTFE u otros materiales relevantes. La cámara está unida, a través de ajustes adecuados con tornillos, presión o acople tipo bayoneta a cualquiera de los extremos delanteros del endoscopio o el extremo que hace contacto con los tejidos del paciente. Se coloca en la unidad de reprocesado del endoscopio y los extremos del conducto del endoscopio y el dispositivo indicador se acoplan a los puertos en la unidad. El proceso se desarrolla como está estipulado y el dispositivo indicador se extrae al final del desarrollo del proceso de análisis, antes de seguir con el procesado o el retorno del endoscopio para su uso.

Ejemplo 12

50 Medios de evaluación del rendimiento de limpieza

[0185] El dispositivo indicador se extrae al final del proceso de análisis. El indicador se inserta en un tubo con reactivo de control de higiene o luminómetro y se procesa según las instrucciones del fabricante, con el dispositivo indicador sustituyendo la muestra. El control de higiene de soporte manual proporciona una lectura en unidades relativas de luz (RLU) que es directamente proporcional a la concentración de ATP generada por la enzima tAK unida al componente biológico. Ésta, a su vez, es directamente proporcional a la concentración de enzima sobre el intervalo de concentraciones utilizado habitualmente para el indicador. Los dispositivos indicadores se calibran, de manera que un valor RLU por debajo de un valor umbral predeterminado es indicativo de por lo menos una reducción logarítmica de tres veces (o potencialmente superior dependiendo del criterio de aceptación) en la

concentración de la fusión de tAK que permanece unida a la superficie del indicador. La liberación en lotes de los instrumentos procesados se basa en la reducción en el valor de RLU generado por la fusión de tAK residual en el dispositivo indicador. Se puede identificar por operarios profesionales para devolver todos los lotes de instrumentos por encima del valor umbral o mediante la calibración del control de higiene para proporcionar una lectura simple de
5 pase o fallo en base al valor de RLU.

[0186] El proceso práctico para permitir el procesamiento posterior de los lotes de instrumentos quirúrgicos u otros productos procesados es el siguiente:

- 10 1. Insertar los dispositivos indicadores en posiciones preestablecidas en la cámara del dispositivo de lavado desinfectador. Sujetar en el lugar.
2. Añadir la carga de instrumentos según el procedimiento operativo estándar. Cerrar la puerta y pulsar el botón de inicio.
3. Durante el desarrollo del proceso, registrar cualquier parámetro del proceso necesario por el procedimiento
15 operativo estándar.
4. Al final del desarrollo del proceso, registrar el tiempo y cualquier parámetro del proceso necesario por el procedimiento operativo estándar.
5. Conectar el control de higiene de soporte manual (SystemSURE Plus™; Higiene) y permitir la calibración.
6. Extraer los dispositivos indicadores de la cámara e insertarlos en el tubo con reactivo (UltraSnap; Higiene).
- 20 7. Inclinar el depósito de reactivo de lado a lado para expulsar todo el reactivo de la base del tubo de muestra (según las instrucciones del fabricante).
8. Agitar el tubo durante 5 segundos.
9. Insertar el tubo en el control de higiene y registrar la señal inmediatamente.
10. Registrar el valor de RLU o la lectura de Pase/Fallo en la hija del desarrollo del proceso.
- 25 11. Repetir las etapas 6-10 para cualquier dispositivo indicador adicional
12. Si se observa cualquier fallo, reprocesar los instrumentos empezando en la etapa 1.
13. Al final de cada día, descargar los resultados a un terminal adecuado acumulador de datos o informático a través del puerto unido.
14. De manera semanal y mensual comprobar la tasa de Pase/Fallo y registrar cualquier tendencia de fallos en el
30 proceso (día de la semana, momento del día, posición en la cámara, operador).

[0187] Este es un ejemplo de un protocolo adecuado, pero serían adecuados un conjunto de tubos de reactivo o instrumentos diferentes (tales como los preparados por BioTrace, Charm u otras compañías) para permitir dichos
35 protocolos de liberación de instrumentos.

Ejemplo 13

Preparación de la fusión tAK-Sup35

- 40 **[0188]** Se generan clones que contenían el dominio N-terminal de Sup35 de *Saccharomyces cerevisiae* fusionado al extremo N o C-terminal, o a ambos extremos, de adenilato quinasas de *S.acidocaldarius* o *T.maritima* mediante técnicas de manipulación de ADN estándar. Todos los clones se transfieren como fragmentos NdeI – Sall en el vector de expresión pMTL1015 y sus secuencias verificadas. Las construcciones de expresión se utilizan para transformar las cepas de expresión BL21 o RV308 y el material desarrollado en condiciones de fermentación a gran
45 escala, pero con una aireación mínima.

- 50 **[0189]** La expresión y purificación de una fusión de tAK-Sup35 son esencialmente las mismas que para las fusiones de péptido de fibrina descritas en el ejemplo 10, a excepción de que la utilización de la etapa de desnaturalización térmica (etapa 4) no es parte del protocolo de purificación. Brevemente, la pasta celular del fermentador se resuspende en el tampón A, y se lisa mediante sonicación. Se extrae residuo celular (no se utiliza tratamiento térmico estandarizado para estos tipos de fusiones) y el sobrenadante se utiliza para la purificación en columna tal como se indica en el ejemplo 10.

- 55 **[0190]** Bajo ciertas condiciones de crecimiento, las proteínas de fusión pueden ser insolubles, siendo evidentes como cuerpos de inclusión en las células. En este caso, los residuos celulares se preparan y se lisan de la misma manera, pero la fracción insoluble resultante, que contiene los cuerpos de inclusión, se recogen mediante centrifugación. Este material se lava en un tampón (por ejemplo, PBS), que contenía Triton X100 (hasta concentraciones del 5%). Después de cada lavado, el residuo celular que contenía las proteínas de fusión se separa mediante centrifugación. Después de 5 lavados, los cuerpos de inclusión se resolubilizan en PBS que contiene urea
60 8M y se agitan suavemente durante 30 minutos. Se extrae cualquier material insoluble residual mediante

centrifugación. El material solubilizado con urea se dializa frente hasta 5 x 10 volúmenes de PBS para eliminar la urea y dejar que se replieguen las proteínas de fusión. Opcionalmente, la urea se puede eliminar más rápidamente mediante pulverización de la preparación solubilizada con urea a través de una aguja de calibre fino en 100 volúmenes de PBS o tampón A agitados rápidamente tal como se utilizan para purificación. El material se deja
5 reposar a temperatura ambiente con agitación hasta 30 minutos antes del procesado siguiente. La figura 5 muestra un análisis electroforético en gel (SDS-PAGE) de Sup35-tAK (Sac) solubilizado y replegado a partir de preparaciones de cuerpos de inclusión aclaradas.

[0191] La purificación posterior de las fusiones se lleva a cabo esencialmente tal como se describe en el ejemplo 10.
10 El sobrenadante de las células lisadas o los cuerpos de inclusión solubilizados o replegados se carga sobre una columna de flujo rápido de Azul Sefarosa preequilibrada. Después de un lavado amplio en tampón A y posteriormente en tampón de lavado, la proteína se eluye utilizando tampón B. Las fracciones máximas se determinan mediante análisis SDS-PAGE y ensayo de enzimas. A continuación, las fracciones se agrupan y se dializan en PBS.

15 ***Conversión de tAK-Sup35 a una forma amiloide***

[0192] Las fusiones Sup35-tAK cuando se ensamblan en fibrilas son más representativas de proteínas amiloides, tales como priones, que son moléculas clave contra las que se evalúa la eficacia de los procesos de
20 descontaminación.

[0193] La forma amiloide de las fusiones Sup35-tAK se genera mediante el replegamiento de la proteína soluble purificada o mediante la modificación de las condiciones utilizadas para la diálisis de las preparaciones de cuerpos de inclusión resolubilizados con urea. En el primer caso, se induce un cambio conformacional mediante la exposición
25 de las proteínas de fusión a condiciones alrededor de pH 14 (por ejemplo, mediante dialización en una solución tamponada adecuadamente a pH 7,4 que contiene opcionalmente hasta 1M de NaCl). En el segundo caso, las proteínas de fusión resolubilizadas en urea 8M/PBS se dializan durante 6-12 horas a temperatura ambiente frente a urea 2 M, NaCl 300 mM, en PBS (pH 7,4). Alternativamente, la fibrilación se puede inducir mediante diálisis frente a Tris 20 mM pH 8,0, EDTA 10 mM bajo condiciones de incubación similares. Se utiliza microscopía electrónica para
30 confirmar la presencia de fibrilas (véase la figura 6).

[0194] Opcionalmente, las proteínas de fusión se pueden incorporar en fibrilas que contienen Sup35 normal. Esto se consigue mediante la mezcla de las fusiones con Sup35 no fusionada expresada de la misma manera, en proporciones entre 1:1 y 1:10 de fusión:Sup35.
35

Deposición de fusiones tAK-Sup35 sobre el soporte sólido.

[0195] La deposición de las fibrilas sobre un soporte sólido se realiza mediante una adsorción simple de proteínas en un tampón adecuado (por ejemplo PBS pH 7,4 tampón bicarbonato pH 9,6) en presencia de niveles elevados de
40 NaCl. La utilización de superficies cargadas o precubiertas (por ejemplo, plásticos cubiertos con Poli-L-lisina) es útil en la disposición de superficies que se pueden unir más eficientemente a las proteínas de fusión.

[0196] Opcionalmente, las fibrilas se pueden depositar en un portador adecuado, tales como sacarosa (hasta el 1%), mucina de cerdo (hasta el 0,05%) o albúmina (hasta 1 mg/ml).
45

Recubrimiento de muestra contaminada de análisis

[0197] A continuación, se recubre una muestra contaminada de análisis (matriz biológica) con la preparación de amiloide adherida sobre la superficie tal como se describe anteriormente.
50

[0198] Entre las matrices biológicas adecuadas en las que se inserta el indicador amiloide se incluyen, por ejemplo, mucina al 0,5%, con o sin albúmina, una muestra contaminada de análisis comercial (tal como la fabricada por Browne) o cualquiera de las muestras contaminadas de análisis identificadas en los documentos de guía publicados por los comités estándar internacionales (por ejemplo, suelo de Edimburgo detallado en HTM 01/01 (UK).
55

Ensamblaje de fibrilas de amiloides en la muestra contaminada de análisis

[0199] Dada la capacidad de los amiloides de autoensamblarse en matrices complejas, es posible mezclar la fusión amiloide-tAK con componentes de la muestra contaminada antes de la formación de fibrilas y el posterior depósito
60 sobre las superficies. Esto proporciona opciones adicionales para indicadores en los que las fibrilas de amiloide se

pueden mezclar e intercalar con otros componentes de la muestra contaminada proporcionando un tipo diferente de matriz que puede ser más dura de eliminar de las superficies.

Ejemplo 14

5

Utilizaciones del indicador de tAK-Sup35

Utilización del indicador de tAK-Sup35 para evaluar la eliminación de priones de superficies en un proceso de lavado

10

[0200] Se prepara un indicador tal como se describe en el ejemplo 13 como fibrilas y seca sobre una superficie de acero en presencia de mucina al 0,5%. El indicador se coloca en la cámara de un equipo de lavado y desinfección en puntos predeterminados. Se añade la carga de instrumentos. El proceso empieza según las instrucciones del fabricante y se completan los registros del proceso. Al final del proceso, y antes de sacar cualquier instrumento de la máquina, el dispositivo indicador se extrae y se evalúa tal como se describe en el ejemplo 12.

15

Utilización de indicador de tAK-Sup35 para evaluar la desactivación de priones en un proceso basado en proteasa

[0201] Se preparan indicadores tal como se describe en el ejemplo 13 como fibrilas con una proporción elevada de Sup35 libre:Sup35-tAK (superior a 5:1) y se depositan sobre tiras de soporte sólido en presencia de suelo de Edimburgo. Los dispositivos indicadores se insertan en un baño de preremolaje que contiene Prionzyme™ recién preparado (Genencor International) para la desactivación de priones (a 60°C, pH 12). Las tiras indicadoras se sujetan al lateral del baño, de manera que los extremos de los indicadores están en el interior del líquido. Los instrumentos se añaden según sea necesario y se procesan durante 30 minutos. Los dispositivos indicadores se extraen del baño al final del proceso, antes de la extracción de los instrumentos y se evalúan según se describe en el ejemplo 12.

20

25

Utilización del indicador de tAK-Sup35 para un proceso oxidativo dirigido a la destrucción de priones.

30

[0202] Se prepara un indicador tal como se describe en el ejemplo 13 como fibrilas utilizando sólo Sup35-tAK y se deposita sobre una superficie de acero inoxidable (opcionalmente en presencia de sacarosa al 0,1% p/v). El indicador se une a la parte interior de la tapa de un recipiente Genesis™ en que se preparan los instrumentos para el procesado y se cierra la tapa. El recipiente se inserta en la cámara de carga de un procesador adecuado para la estimulación oxidativa (por ejemplo, el esterilizador de ozono de 125L; TSO₃ o una tecnología de peróxido de hidrógeno en fase vapor, tal como la descrita en los artículos publicados por Fichet et al 2004; Lancet) y el proceso se desarrolla según las instrucciones del fabricante. Al final del proceso, se saca el recipiente Genesis de la cámara y se extraen los dispositivos indicadores y se procesan tal como se describe en el ejemplo 12.

35

Ejemplo 15

Preparación de una muestra de contaminación neurológica con componente acoplados a tAK

Identificación de componentes esenciales para una muestra de contaminación neurológica de análisis

45

[0203] En estudios experimentales se pueden determinar componentes diana críticas hallados en procesos neuroquirúrgicos que permanecen unidos a las superficies de los instrumentos quirúrgicos. Los instrumentos quirúrgicos de las salas neuroquirúrgicas se pueden tratar en proceso de limpieza rutinarios. La proteína residual u otras moléculas biológicas se pueden solubilizar de la superficie del instrumento utilizando una hidrólisis ácida parcial, limpiadores alcalinos fuertes o con la utilización de enzimas líticas adecuadas (por ejemplo proteasas, nucleasas, lipasas). A continuación, las moléculas principales se pueden determinar utilizando técnicas de espectrometría de masas, tales como la ionización por desorción láser aumentada en superficie (SELDI) equivalentes.

50

[0204] El mismo análisis se puede conseguir mediante la contaminación artificial de instrumentos quirúrgicos con material neurológico humano o muestras equivalentes de especies animales (por ejemplo, homogenatos de cerebro de roedor).

55

[0205] Una muestra de contaminación neurológica de análisis representativa requerirá un conjunto de componentes que incluyen, entre otros, proteínas derivadas de nervios (por ejemplo, neurofilamentos), lípidos o glicolípidos

60

representativos de entornos neuronales (por ejemplo, gangliósidos ricos en siálico) y carbohidratos. Si la muestra contaminante de análisis se diseña para tratar cuestiones particulares referentes a enfermedades específicas, tales como enfermedades causadas por la agregación de proteínas (por ejemplo, la enfermedad de priones, enfermedad de Alzheimer), entonces estos componentes, o sustitutos de los mismos, también serán adiciones valiosas a la muestra de contaminación de análisis.

Reticulación de fusiones de tAK a proteína o glicolípido

[0206] También se puede producir una fusión de tAK recombinante a proteínas de neurofilamentos o subdominios de las mismas mediante la utilización de los métodos esencialmente descritos en los ejemplos 10 y 13.

[0207] Además, la reticulación se puede conseguir sin la necesidad de generar clones de expresión recombinante. Esto puede ser particularmente útil cuando las proteínas altamente glicosiladas o glicolípidos están unidos a la tAK. En este caso, la proteína o glicolípido se purifica a partir de una fuente adecuada o se genera mediante la expresión de una construcción génica adecuada en una línea celular eucariota (por ejemplo, célula de mamífero, sistema de expresión de baculovirus). La purificación puede ser a través de una variedad de métodos de purificación de proteínas conocidos o mediante la solubilización en detergentes de lípidos de membrana. A continuación, el material purificado se retícula a tAK purificada utilizando uno entre una amplia variedad de químicas de acoplamiento (por ejemplo, SPDP (Pierce chemicals) utilizado para unir proteínas a través de aminas primarias en proteínas; tratamiento con meta-peryodato utilizado para abrir los grupos carbohidrato que permiten la reticulación a glicolípidos). Más métodos adecuados para realizar la reticulación de la tAK con moléculas que contiene carbohidratos o lípidos se describen en detalle en el ejemplo 23.

[0208] De particular utilidad en esta aplicación es el acoplamiento covalente de la tAK a componentes biológicos, tales como gangliósidos, incluyendo aquellos específicos para células neuronales (por ejemplo GT_{1b}, GT_{1a}) y aquellos de origen celular general (por ejemplo GM₁). Los gangliósidos se purifican mediante métodos estándar que implican la solubilización en detergentes, la separación en fases y la centrifugación diferencial. Alternativamente, el indicador se puede formular utilizando gangliósidos purificados disponibles comercialmente.

30 Conjugación de tAK a componentes de ácido nucleico de muestra de contaminación neurológica de análisis

[0209] La tAK se reticula a un ácido nucleico adecuado, purificado, generado sintéticamente o amplificado a partir de un molde utilizando PCR o técnicas similares. La reticulación se puede conseguir mediante la incorporación de un marcador de biotina sobre el ácido nucleico, por ejemplo, durante la síntesis, y utilizando una tAK reticulada a estreptavidina.

Deposición de componentes de muestra de contaminación de análisis sobre soporte sólido

[0210] La deposición de uno o más indicadores de tAK sobre un soporte sólido se puede conseguir tal como se describe en los ejemplos 10 y 13. Brevemente, los complejos de tAK se preparan en tampón PBS o tampón bicarbonato (pH 9,6) y se deja secar en una superficie de policarbonato durante 30 minutos a temperatura ambiente. Opcionalmente, se puede añadir sacarosa hasta concentraciones de 1% p/v. Las condiciones de unión se diseñan para favorecer la unión a través del componente biológico en lugar de la tAK, por ejemplo, mediante el bloqueo de grupos activos restantes en la superficie de la tAK utilizando un agente de modificación de la superficie adecuado o mediante la incorporación de niveles elevados de NaCl.

[0211] Opcionalmente, la muestra de contaminación neurológica depositada se puede fijar mediante el tratamiento con etanol o isopropanol al 0%. Para conseguir esto, el indicador se incuba en isopropanol al 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto mimetiza uno de los procesos hallados habitualmente que pueden incrementar la resistencia de materiales contaminantes en instrumentos quirúrgicos y, por tanto, proporciona al indicador una manera eficaz de monitorizar la eliminación de dichos materiales.

Ejemplo 16

55 Preparación de fusiones de proteína de cápside de norovirus (58kDa) – tAK

[0212] Se genera un gen que codifica una proteína de cápside de 58 kDa de norovirus como una construcción sintética. Este clon se clona en el extremo 5' del gen que codifica la Adenilato quinasa termoestable de *Thermotoga maritima* para generar una única proteína de fusión. Después de la verificación de la secuencia, este clon se transfiere en un vector pMTL para la expresión en *E.coli* o en un sistema de expresión de baculovirus (por ejemplo,

sistema de expresión BacPAK; Clontech) para la expresión en líneas celulares de insectos, tales como células SF9.

Expresión y purificación

5 **[0213]** La expresión de las fusiones de proteína de cápside-quinasa termoestable en *E.coli* se lleva a cabo esencialmente tal como se describe en los ejemplos previos. Las proteínas se purifican utilizando un protocolo similar en Flujo rápido de Azul Sefarosa sin etapa de desnaturalización térmica aplicada durante el protocolo de lisis celular. Las proteínas purificadas se analizan mediante análisis de SDS-PAGE y mediante ensayo enzimático tal como se describe en los ejemplos previos. El ensamblaje de las proteínas de fusión en partículas de tipo viral (VLP) es inducido mediante la alteración del pH y la concentración de sal.

10 **[0214]** La expresión en baculovirus y posterior purificación se lleva a cabo esencialmente tal como se describe en Jiang et al., (1992) "Expression, self-assembly and antigenicity of the norwalk virus capsid protein", Journal of Virology, 66, páginas 6527-6352.

Deposición en soportes sólidos

15 **[0215]** Las VLP-tAKs purificadas se depositan sobre un soporte sólido adecuado para validar la limpieza y desinfección de superficies utilizadas en la preparación de alimentos o después de brotes de norovirus en el entorno hospitalario.

20 **[0216]** Para validar la descontaminación de superficies para la preparación de alimentos, se preparan VLP-tAK en un tampón PBS que contiene un extracto de comida cruda que comprende albúmina de huevo y sacarosa. Esta matriz se recubre sobre una tira de polivinilo que mide 5 cm x 5 cm y se deja secar durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.

25 **[0217]** Para evaluar la descontaminación de una instalación sanitaria potencialmente contaminada después de un brote de norovirus, se producen indicadores de VLP-quinasa termoestable en una preparación diseñada para mimetizar la contaminación relacionada con la sanidad. Ésta incluía varias proteínas relacionadas con la sangre descritas anteriormente, o uno de los contaminantes de chata estándar incluidos en los patrones de descontaminación nacional e internacional. Los indicadores particularmente eficaces se establecen utilizando soportes sólidos de tejido representativos de, por ejemplo, cortinas o batas de hospital.

Utilización de fusiones de VLP de norovirus-tAK para la validación de procesos de eliminación de virus

35 **[0218]** Las fusiones de VLP de norovirus-tAK son particularmente ventajosas para validar la capacidad de procesos de eliminar norovirus de muestras de agua o alimentos. Mantienen las propiedades de tamaño, carga e hidrofobicidad del virus parental y, por tanto, mimetizarán su comportamiento en procesos de eliminación. Esto es particularmente útil en este caso ya que no existe un método de cultivo para norovirus y, por tanto, actualmente no es posible medir la purificación de virus vivos de otro modo que no sea RT-PCR, un método que potencialmente consume tiempo.

40 **[0219]** Por ejemplo, las fusiones de VLP de norovirus-tAK se ponen en una fuente de agua y se filtran a través de un proceso diseñado para eliminar partículas virales. Se introducen suficientes virus para medir el nivel requerido de purificación viral. Se mide la cantidad de VLP después de la filtración y se evalúa frente a los criterios de pase/fallo predeterminados.

Ejemplo 17

50 Generación de fusiones de proteína de cubierta de bacteriófago MS2-tAK

[0220] La generación de proteínas de cubierta de MS2 y su ensamblaje espontáneo en partículas de tipo viral se ha descrito en un conjunto de estudios, por ejemplo, en Peabody (2003), "A viral platform for chemical modification and multivalent display", Journal of Nanobiotechnology, vol 1, página 5.

55 **[0221]** La secuencia proteica de la proteína de cubierta de MS2 capaz de generar VLP cuando se expresa en *E.coli* se proporciona a continuación (SEQ ID 62):

MASNFTQFVL VDNNGTGDVT VAPSNFANGV AEWISSNSRS QAYKVTCSVR QSSAQNRKYT IKVEVPKVAT
60 QTVGGVELPV AAWRSYLNME LTIPIFATNS DCELIVKAMQ GLLKDGNIPI SAIANSIGY

[0222] Las construcciones de proteínas de cubierta de MS2 se generan con la tAK de *Thermatoga maritima*, fusionada en el extremo N o C terminal de la proteína expresada. Dependiendo de la localización de la fusión, esto da lugar a la incorporación de la tAK en el lumen de la VLP o expuesta en la superficie. Las dos localizaciones
 5 presentan propiedades útiles para su aplicación como indicadores. Opcionalmente, la proteína de cubierta de MS2 se puede modificar mediante la inclusión de un residuo de cisteína en la posición 15 en la secuencia nativa (sustitución de treonina15 a cisteína). Las fusiones de VLP-tAK se purifican utilizando una combinación de los métodos descritos para las fusiones de tAK anteriores (Ejemplos 10 y 13) con etapas adicionales de intercambio iónico, si son necesarias. Las VLP intactas que incorporan la tAK también se pueden purificar en base a la exclusión
 10 por tamaño utilizando una columna de Sefarosa CL-4B.

[0223] Alternativamente, la tAK purificada se puede reticular a VLP de MS2 utilizando reactivos de reticulación química. Brevemente, la tAK de *S.acidocaldarius* se derivatiza con SPDP y se reduce para producir un grupo sulfhidrilo reactivo. A continuación, se mezcla con las VLP de MS2 que contienen la variante T15C de la proteína.
 15 Esto produce enlaces disulfuro covalentes entre los dos miembros. Estos tipos de moléculas unidas covalentemente se pueden utilizar indistintamente con las fusiones genéticas del resto de estos ejemplos.

Deposición de fusiones de proteína de cubierta de MS2 - tAK en soportes sólidos

20 [0224] Las VLP de MS2 que contienen tAK purificadas se depositan en superficies de una manera similar a las fusiones descritas en los ejemplos previos utilizando técnicas estándar de adsorción de proteínas. Opcionalmente, se pueden utilizar superficies muy cargadas o hidrófobas para proporcionar una indicación de la eliminación viral de superficies específicas en regímenes de procesos.

25 [0225] La fusión de VLP-tAK se puede depositar sola o puede estar contenida en una matriz de muestra de contaminación adecuada diseñada para representar la contaminación hallada durante el proceso de tratamiento a validar. Por ejemplo, se puede utilizar la contaminación de una chata para la evaluación o validación de la eliminación de materia fecal de chatas, lavabos o durante episodios de diarrea.

Utilización de fusiones MS2-tAK para validar un régimen de limpieza

[0226] El indicador de MS2-VLP se coloca en una superficie cerámica tal como se ha descrito anteriormente. El indicador cerámico se expone a la misma química de limpieza que las superficies del baño a limpiar, por ejemplo, a hipoclorito sódico diluido en una dilución de aproximadamente 2,5% (v:v), y bajo las mismas condiciones (30 minutos
 35 a temperatura ambiente). Al final del proceso, el indicador cerámico se inserta en un tubo para el control de higiene y la MS2-tAK residual se mide utilizando el método del ejemplo 12. Si está limpio por debajo de un umbral predeterminado, entonces se estima que el régimen de limpieza ha sido satisfactorio. En caso contrario, se requiere repetir la limpieza para minimizar cualquier riesgo de transmisión de enfermedades.

Utilización de fusiones de MS2-tAK para validar un proceso de eliminación viral

[0227] Dado que las VLP MS2-tAK mimetizan el tamaño, la carga de superficie y la hidrofobicidad del virus parental y son capaces de representar una amplia variedad de virus relacionados (por ejemplo virus de la polio), estos indicadores son extremadamente útiles para validar los procesos de eliminación viral a nivel de laboratorio o campo.
 45 La rapidez del ensayo de tAK proporciona ventajas significativas sobre los métodos tradicionales basados en cultivos.

[0228] Por ejemplo, se puede validar un sistema de tratamiento de aguas in situ utilizando las VLP MS2-tAK. Se colocan VLP MS2-tAK suficientes en el agua de entrada en la planta de tratamiento para proporcionar una estimación logarítmica de la purificación suficiente para la eficacia del proceso, según se determina mediante regulaciones nacionales o locales. Por ejemplo, se colocan 10^9 VLP-tAK por litro en el agua de entrada. El proceso se realiza y se analizan muestras de aproximadamente 1 ml del agua después del proceso en un sistema de tubo para el control de higiene adecuado (por ejemplo Aqua-trace™, Biotrace UK). Un valor que indica menos de 1 VLP-tAK por ml de agua sería suficiente para demostrar una purificación de virus 6 veces logarítmica mediante el proceso
 55 empleado. Esto se podría realizar a los dos minutos después de completar el proceso en lugar de las 16-24 horas que se necesitarían para un método estándar basado en cultivos en *E.coli*.

[0229] Dichos métodos son relevantes para validar una amplia gama de procesos de desactivación viral utilizados ampliamente en las industrias de la sanidad, alimentación, agua o farmacéutica. En la amplia mayoría de los casos,
 60 se puede sustituir la utilización del bacteriófago MS2 parental, utilizado ampliamente para validar procesos de

eliminación viral, proporcionando una determinación mucho más rápida y sensible de la eliminación. Por ejemplo, la purificación del agua a través de microfiltros cerámicos (que sustituyen el bacteriófago parental en Wegmann et al., 2007, "Modification of ceramic microfilters with colloidal zirconia to promote the adsorption of viruses from water"), el tratamiento del agua con cloro gas (Clevenger et al., 2007, "Comparison of the desactivation of Bacillus subtilis spores and MS2 bacteriophage by MIOX, ClorTec and hypochlorite", J Applied Microbiology, 103, p2285-2290), la validación de la eficacia virucida del lavado de manos (Jones et al., 1991, "The use of bacteriophage MS2 as a model system to evaluate virucidal hand disinfectants", J Hospital Infection, 17, p279-285). Otros ejemplos serían validar, en el proceso, la eliminación de partículas virales de la sangre fraccionada, extracto celular de origen humano o animal, productos farmacéuticos, preparación de alimentos (por ejemplo, extractos de moluscos).

Ejemplo 18

Preparación de más fusiones quinasa-VLP adecuadas para evaluar y validar la eliminación o destrucción viral

[0230] La tabla siguiente enumera una serie de proteínas de fusión de VLP que son valiosas en el desarrollo de indicadores para valorar la eliminación o desactivación de un rango de patógenos virales. Éstos representan patógenos reales en los que la validación de la eliminación puede ser esencial o virus modelo capaces de representar la eliminación de un rango de patógenos relacionados. Los patógenos son del campo médico y veterinario y también comprende un rango de patógenos zoonóticos conocidos o posibles que pueden transmitirse de animales a humanos.

Tabla 2: Componentes biológicos adecuados para la preparación de fusiones quinasa-VLP para evaluar y validar la eliminación o destrucción viral

Virus	Fragmento recombinante	Sistema de expresión	Referencia
Bacteriófago, por ejemplo MS2, PP7	Proteína de cubierta de MS2 Proteína de cubierta de PP7	E.coli (vector de expresión pET3d)	Peabody et al., 2003, Journal of Nanobiotechnology, 1, pág 5
Norwalk (norovirus)	Cápside	Baculovirus	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
Rotavirus	VP2, VP6 y VP7	Baculovirus	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
SARS (coronavirus)	S, E y M	Baculovirus	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
Lengua azul	VP2	Baculovirus	Roy et al., 1994, Vaccine, 12, pág 805-811
Virus del papiloma humano	Proteína estructural principal viral, L1	Células 293TT	Buck et al., 2005, J Virology, 79, pág 2839; Buck et al., 2004, J. Virology, 78, pág 751
Hepatitis B	Proteína de envoltura pequeña (HBsAg)	Células de levadura o mamífero	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
Hepatitis C	Núcleo, E1 y E2	Baculovirus, células de levadura y mamífero	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
Gripe; Cepas humana (por ejemplo H5N1) y cepas de gripe aviar.	Hemaglutinina, neuraminidasa y matriz (M1 opcional)	Baculovirus, células de mamífero	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65

Poliovirus	Cápside (VP0.1 y 3)	Baculovirus	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
VIH	Pr55gag, envoltura	Baculovirus, células de levadura y mamífero	Revisado en Grgacic y Anderson, 2006, Methods, 40, pág 60-65
Dengue B	Envoltura (e) y premembrana/ membrana (prM/M)	Células de mamífero	Purdy and Chang, 2005, Virology , 333, pág 239-250

[0231] La secuencia proteica del monómero y dímero de la proteína de cubierta del bacteriófago PP7 (Caldeira y Peabody, 2007, Journal of Nanobiotechnology, 5, pág 10) se proporciona a continuación. Los genes de la quinasa termoestable se pueden fusionar al extremo C-terminal del monómero o el dímero.

5

Monómero de PP7 (SEQ ID 63)

[0232]

10

SKTIVLSVGEATRTLTEIQSTADRQIFEEKVGPLVGRRLRTASLRQNGAKTAYRV
NLKLDQADVDCSTSVCGELPKVRYTQVWSDVTIVANSTEASRKSLYDLTKSL

15

VVQATSEDLVVNLVPLGR

Dímero de PP7 (SEQ ID 64)

20 **[0233]**

MSKTIVLSVGEATRTLTEIQSTADRQIFEEKVGPLVGRRLRTASLRQNGAKTAYR
25 VNLKLDQADVDSGLPKVRYTQVWSDVTIVANSTEASRKSLYDLTKSLVATSQ
VEDLVVNLVPLGRYGSKTIVLSVGEATRTLTEIQSTADRQIFEEKVGPLVGRRLRT
ASLRQNGAKTAYRVNLKLDQADVDSGLPKVRYTQVWSDVTIVANSTEASRK
30 SLYDLTKSLVATSQVEDLVVNLVPLGR

Ejemplo 19

35 **Expresión de fusiones quinasa – proteína fimbrial bacteriana para utilizar en el desarrollo de indicadores para valorar la eliminación de películas de las superficies.**

[0234] Se genera una fusión entre la tAK de *Thermotoga maritima* y la proteína CsgA de *E.coli* mediante clonación recombinante estándar que es conocida por los expertos en la materia. La secuencia de la proteína generada se muestra a continuación.

40

Secuencia de la proteína CsgA de E.coli (SEQ ID 65)

45 **[0235]**

MKLLKVAIAAIVFSGSALAGVVPQYGGGGNHGGGGNNSGPNSLNIIYQYGGG
NSALALQTDARNSDLTITQHGGGNGADVGGQSDDSSIDL TQRGFGNSATLDQ
WNGKNSEMTVKQFGGGNGAAVDQTASNSSVNVVTQVGFNNATAHQY

50

Secuencia de Adenilato quinasa de Thermotoga maritima fusionada al extremo N-terminal de la proteína CsgA (SEQ ID 67)

[0236]

5 MMAYLVFLGPPGAGKGYAKRIQKTGIPHISTGDIFRDIVKKENDELGKKIKEIM
 EKGELVPDELVNEVVKRRLSEKDCEKGFILDGYPRRTVAQAEFLDSFLESQNKQL
 10 TAAVLFDVPEDVVVQRLTSRRICPKCGRIYNMISLPPKEDELCDCKVKLVQRD
 DDKEETVRHRYKVYLEKTQPVIDYYGKKGILKRVDGTIGIDNVVAEVLKIIGWSDK
 GSGVVPQYGGGGNHGGGGNNSGPNSELNIYQYGGGNSALALQTDARNSDLTI
 15 TQHGGGNGADVGGQSDSSIDL TQRGFGNSATLDQWNGKNSEMTVKQFGGG
 NGAAVDQTASNSSVNVTQVGFGNNATAHQY

20

[0237] Para la expresión, se transfiere el clon a un vector de expresión adecuado, tal como pET 32a (Novagen) o pMALC2x (New England Biolabs) y la proteína se expresa en una cepa huésped adecuada (por ejemplo BL21) bajo condiciones de crecimiento normales.

25 **[0238]** Dependiendo de las condiciones de crecimiento, la fusión de quinasa termoestable-CsgA se puede expresar de manera soluble en el citoplasma de las células o como un cuerpo de inclusión insoluble en la célula. En el primer caso, la purificación se lleva a cabo tal como se describe en los Ejemplos 10 y 13. En el segundo, los cuerpos de inclusión se aíslan mediante centrifugación después de la lisis celular y se lavan extensamente en tampón que contiene Triton X100 al 1%. Los cuerpos de inclusión se solubilizan mediante suspensión en urea 8M o clorhidrato de guanidina 6 M y, a continuación, se repliegan mediante diálisis rápida en tampón con muy poca sal (habitualmente menos de 20 mM de NaCl).

35 **[0239]** La generación de capas de autoensamblaje está mediada por la incubación de la proteína de fusión purificada y enzimáticamente activa con una superficie hidrófoba (por ejemplo Teflon) en Tris 10 mM pH 8. Para superficies hidrofílicas, tales como acero inoxidable o vidrio, la fusión se incuba en tampón de acetato de sodio 50 mM pH 4, opcionalmente en presencia de Tween 20 al 0,1 %. Se pueden utilizar temperaturas elevadas de hasta 80°C para aumentar la unión o para asegurar el cubrimiento uniforme de superficies.

40 **[0240]** También se pueden utilizar fusiones con las secuencias de proteínas equivalentes de otros organismos Gram positivos o Gram negativos (por ejemplo, AgfA de especie Salmonella).

Secuencia proteica de la proteína AgfA de Salmonella (SEQ ID 66)

[0241]

45 MKLLKVAFAAIVVSGSALAGVVPQWGGGGNHGGGNSSGPDSTLSIYQYGS
 ANAALALQSDARKSETTITQSGYGNAGADVGGQADNSTIELTQNGFRNNATIDQ
 50 WNAKNSDITVGQYGGNNAALVNQTASDSSVMVRQVGFGNNATANQY

Ejemplo 20

55 **Más péptidos y proteínas de autoensamblaje para la generación de biopelículas**

[0242] También se proporciona la generación de más dispositivos indicadores que contienen fusiones de tAK con péptidos capaces de autoensamblarse en fibrilas, o biopelículas reactivas a superficie. En la tabla siguiente se muestra una lista de compañeros de fusión adecuados.

60

Tabla 3: Péptidos y proteínas de autoagregación/ensamblaje adecuados para la generación de biopelículas

Proteínas y péptidos autoagregantes	Proteína recombinante	Sistema de expresión	Referencia
Sup 35	Dominio N-terminal de Sup 35 o péptido Sup35	E.coli, levadura	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Het S, Ure2, Rnq1, New 1	Secuencia nativa o fragmentos de la misma	E.coli, levadura	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág. 1-77; Derkatch et al., 2007, Proc Natl Acad Sci US, 101, pág 12934-12939
Beta amiloide (enfermedad de Alzheimer)	A β 1-32	E.coli, levadura; péptido sintético	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Proteínas de cemento de percebe	Por ejemplo, proteína de 19kDa de <i>B. albicostatus</i> ; proteína de 20kDa de <i>Megabalanus rosa</i> ; nueva proteína dependiente de calcita de <i>B. albicostatus</i>	E.coli, levadura o baculovirus	Urushida et al., 2007, FEBS J., 274, pág 4336-4346; Nakano et al., 2007, Biomacromolecules, 8, pág 1830-1835; Kamino, 2001, Biochem J., 356, pág 503-5077.
Apolipoproteína A1 como por ejemplo de trastornos de apolipoproteínas	Residuos 1-93 de ApoA1	E.coli, levadura, células de mamífero	Andreola et al., 2003, J Biol Chem, 278, pág 2444
Tau (asociada con la enfermedad de Alzheimer)	Proteínas o péptidos que contienen los residuos 306-311 (VQIVYK)	E.coli, levadura o células de mamífero	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Proteína 2 de unión a poliadenina	Péptidos que contienen residuos 2-11 (AAAAAAAAA)	E.coli, levadura o células de mamífero	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Proteína C de surfactante de pulmón	Péptidos que contienen los residuos 9-22 (VVVVVVVLVVVV IV)	E.coli, levadura o células de mamífero	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Subunidad CgsA (adhesión a superficies y la formación de biopelículas en E.coli)	Secuencia nativa de CgsA catalizada por la secuencia de CsGB	E.coli	Gebbink et al., 2005, Nat Rev Microbiol, 3, pág 333; Hammer et al., 2007, PNAS, 104, pág 12494
AgfA ((adhesión a superficies, interacciones célula-célula y formación de biopelículas en Salmonella spp)	Secuencia nativa	E. coli	Revisado en Harrison et al., 2007, Rev Physiol Biochem Pharmacol, 159, pág 1-77
Adhesinas de la superficie celular formadora de amiloides formadoras de flóculos y bacterias filamentosas en lodo activado	Varias secuencias nativas	E. coli	Descrito en Larsen et al., 2008, Appl Env Microbiol. Cita en línea (Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.02274-07v1)
Glicoproteína B(gB) del	Péptidos que contienen	E.coli o células de	Cribbs et al., 2000,

virus del Herpes simplex	aminoácidos 22-42	mamífero	Biochemistry, 39, pág 5988-5994
Hidrofobinas (de varias especies fúngicas, por ejemplo, SC3 de Schizophyllum commune, RodA/B de Aspergillus fumigatus)	Secuencias nativas o péptidos derivados que contienen el dominio de 8 cisteínas del núcleo de la hidrofobina	E.coli, levadura o Pichia pastoris	Gebbink et al., 2005, Nat Rev Microbiol., 3, p333; Sunde et al., 2007, Micron e-pub
Chaplinas/Rodlinas (Streptomyces spp)	Proteínas chaplinas ChpA,B, C,D,E,F,G,H; proteínas rodlinas RdIA y RdIB y combinaciones de las mismas	E.coli, levadura o pichia pastoris	Gebbink et al., 2005, Nat Rev Microbiol, 3, pág 333
Proteínas de cubierta de esporas gram positivas (por ejemplo, similar en la secuencia o estructura global con aquellas que forman apéndices de los lazos en Clostridium taeniosporum)	P29a, P29b, GP85, y un análogo de SpoVM	E.coli, Clostridia	Walker et al., 2007, Mol Micro., 63, pág 629-643

Ejemplo 21

Indicadores para monitorizar la eficacia de la limpieza de lentes de contacto para la eliminación de biopelículas

[0243] Existe una gama de bacterias y virus que plantean un riesgo para los portadores de lentes de contacto en forma de plancton y biopelícula. Se pueden generar ventajosamente dispositivos indicadores para monitorizar la eficacia de métodos de limpieza para la eliminación de dichos organismos.

[0244] Las fusiones fimbriales descritas anteriormente pueden proporcionar una indicación de a eliminación de patógenos Gram negativos. Cualquier miembro de la familia de genes de hidrofobinas es una fusión indicadora adecuada para la eliminación de patógenos fúngicos donde estás moléculas muy conservadas son los mediadores principales de unión. Los genes de hidrofobinas, o equivalentes de especies de *Fusarium* y *Candida albicans*, son adecuados, ya que estos organismos representan una de las mayores amenazas para la infección ocular conduciendo a la ulceración y lesión a largo plazo.

[0245] Las proteínas de fusión se pueden generar con cualquiera de estas moléculas y se pueden formular en películas adecuadas tal como se describe en los ejemplos anteriores. Estos indicadores se pueden incorporar como parte de la cámara de lavado, en que deben limpiarse las lentes de contacto reutilizables. El proceso se realiza durante el periodo de tiempo apropiado y se extrae la lente. Se extrae el indicador y se valora la presencia de la proteína de fusión activa utilizando un control de higiene de la manera habitual. Si está por debajo de los valores umbrales preestablecidos, la lente de contacto es adecuada para la reutilización. Si está por encima ("fallo"), entonces la lente de contacto debe reprocesarse o destruirse.

Secuencia proteica de la proteína hidrofobina 3 de la especie Fusarium (SEQ ID 68)

[0246]

MQFSTLTTVFALVAAVAAPHGSSGGNNPVCSAQNNQVCCNGLLSCAVQVLG
SNCNGNAYCCNTEAPTGT LINVALLNCV KLL

Secuencia proteica de proteína hidrofobina 5 de la especie Fusarium (SEQ ID 69)

[0247]

MKFSLA AVALLGAVVSALPAN EK RQAYIPCSGLYGTSQCCATDVLGVADLDCG
 NPPSSPTDADNFSAVCAEIGQRARCCVLPILDQGGILCNTPTGVQD

5 **Ejemplo 22**

Generación de fusiones de tAK a proteínas de tipo cemento para utilizar en la determinación de la eliminación de biopelículas

10 **[0248]** Se fusiona tAK de *Thermotoga maritima* a la proteína de 19KDa de *Balanus albicostatus* y se expresa como se ha descrito anteriormente. La purificación se realiza a partir de una fracción soluble o insoluble. El repliegue y la posterior deposición de la película que contiene tAK sobre un soporte sólido se consigue como en el ejemplo 19. El grosor, la velocidad de deposición y la posterior eliminación de la biopelícula se pueden alterar mediante la modificación de la concentración de sales y el pH y mediante la alteración de la concentración de la proteína de
 15 fusión.

[0249] Las secuencias proteicas de proteínas de tipo cemento de percebe adecuadas para utilizar en la invención se describen a continuación. La quinasa termoestable puede estar fusionada a cualquiera de los extremos N o C terminal de las proteínas de cemento.

20

[02501] Secuencia proteica de proteína de tipo cemento de *Balanus albicostatus* (19k) (SEQ ID 70)

VPPPCDLSIKSKLKQVGATAGNAAVTTTGTTS GSGVVKCVVRTPTSVEKKA AVG

25

NTGLSAVSASAANGFFKNLGKATTEVKTTKDGTKVKTKTAGKGKTGGTATTIQIA

DANGGVSEKSLKLDLLTDGLKFVKVTEKKQGTATSSSGHKASGVGH SVFKVLN

EAETELELKGL

30

[0251] Secuencia proteica de proteína de tipo cemento de *Megabalanus rosa* (20k) (SEQ ID 71)

MKWFLFLLTTAVLAAV VSAHEEDGVCNSNAPCYHCDANGENCSCNCE LFDCEA

35

KKPDG SYAHP CRRCDANNICKCSCTAIPC NEDHPCHHCHEEDDGDTHCHCSC

EHS HDHDD DTHGECTKKAPCWRCEYNADLKH DVCGCECSKLP CNDEHPCY

40

RKEGGV VSCDCKTITCNEDHPCYHS YEEDGVTKSDCDCEHSPGPSE

[0252] Secuencia proteica de fusión de la proteína de percebe de *Balanus albicostatus* con la tAK de *Thermotoga maritima*; fusión N-terminal (SEQ ID 72)

45

50

55

60

MRVLVINSGSSSIKYQLIEMEGEKVLCKGIAERIGIEGSRLVHRVGDEKHVIEREL
 PDHEEALKLILNTLVDEKLGVIKDLKEIDAVGHRVVHGGGERFKESVLVDEEVLKAI
 5 EEVSPLAPLHNPANLMGIKAAMKLLPGVPNVAVFDTAHFQTIPQKAYLYAIPYEY
 YEKYKIRRYGFHGTSHRYVSKRAAEILGKKLEELKIITCHIGNGASVAAVKYGKCV
 10 DTSMGFTPLEGLVMGTRSGDLPAIPFFIMEKEGISPQEMYDILNKKSGVYGLSK
 GFSSDMRDIEEAALKGDEWCKLVLEIYDYRIAKYIGAYAAAMNGVDAIVFTAGVG
 ENSPITREDVCSYLEFLGVKLDKQKNEETIRGKEGIISTPDSRVKVLVPTNEELM
 15 IARDTKEIVEKIGRVPPPCDLSIKSKLKQVGATAGNAAVTTTGTTSVSGVVKCVV
 RTPTSVEKKAAVGNTGLSAVSASAANGFFKNLKGATTEVKTTKDGTKVKTCTAG
 20 KGKTGGTATTIQIADANGGVSEKSLKLDLLTDGLKFVKVTEKKQGTATSSSGHK
 ASGVGHSVFKVLNEAETELELKGL

[0253] *Secuencia proteica de fusión de la proteína de percebe de Balanus albicostatus con la tAK de Thermotoga maritima; fusión C-terminal (SEQ ID 73)*

VPPPCDLSIKSKLKQVGATAGNAAVTTTGTTSVSGVVKCVVRTPTSVEKKAAVG
 30 NTGLSAVSASAANGFFKNLKGATTEVKTTKDGTKVKTCTAGKGKTGGTATTIQIA
 DANGGVSEKSLKLDLLTDGLKFVKVTEKKQGTATSSSGHKASGVGHSVFKVLE
 AETELELKGLMRVLVINSGSSSIKYQLIEMEGEKVLCKGIAERIGIEGSRLVHRVG
 35 DEKHVIERELPDHEEALKLILNTLVDEKLGVIKDLKEIDAVGHRVVHGGGERFKESV
 LVDEEVLKAI EEVSPLAPLHNPANLMGIKAAMKLLPGVPNVAVFDTAHFQTIPQK
 40 AYLAYAIPYEY YEKYKIRRYGFHGTSHRYVSKRAAEILGKKLEELKIITCHIGNGASV
 AAVKYGKCVDTSMGFTPLEGLVMGTRSGDLPAIPFFIMEKEGISPQEMYDILN
 45 KKSGVYGLSKGFSSDMRDIEEAALKGDEWCKLVLEIYDYRIAKYIGAYAAAMNG
 VDAIVFTAGVGENSPITREDVCSYLEFLGVKLDKQKNEETIRGKEGIISTPDSRVK
 VLVPTNEELMIARDTKEIVEKIGR

[0254] *Secuencia proteica de nuevas proteínas de cemento de percebe para utilizar en la generación de proteínas de fusión de quinasa termoestable. La agregación dependiente de calcita y la adherencia de esta proteína permiten que este tipo de indicador monitorice procesos capaces de eliminar iones minerales de agregados de manera que se desestabiliza y elimina la bioincrustación o biopelículas. La quinasa termoestable se puede fusionar opcionalmente al extremo N-terminal o C-terminal. Secuencia de Mori et al., 2007, Calcite-specific coupling protein in barnacle underwater cement; FEBS Journal, 274, pág 6436-6446. Secuencia proteica de adsorbente específico de calcita de Balanus albicostatus (SEQ ID 74)*

60

MKYTLALLFLTAIIATFVAAHKHHDHGKSCSKSHPCYHCHTDCECNHHHDDCNR
 SHRCWHKVVHGVVSGNCNCNLLTPCNQKHPCWRRHGKKHGLHRKFHGNACN
 5 CDRLVCNAKHPCWHKHCDRFC

[0255] *Secuencia peptídica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe para utilizar en la formación de preparaciones de biopelículas de péptidos que contienen quinasa termoestable. Secuencias derivadas de Nakano et al., 2007, Self assembling peptide inspired by a barnacle underwater adhesive protein; Biomacromolecules, vol 8, pág 1830-1835.*

Péptido 1 (SEQ ID 75)
 SKLPCNDEHPCYRKEGGVSCDCK

15 Péptido 2 (SEQ ID 76)
 SKLPSNDEHPSYRKEGGVSSDSK

Péptido 3 (SEQ ID 77)
 20 KTITCNEDHPCYHSYEEDGVTKSDCDCE

Utilización de la fusión de cemento – tAK para monitorizar la limpieza de dispositivos médicos

[0256] El indicador descrito anteriormente se deposita sobre acero inoxidable de un grado representativo de los instrumentos quirúrgicos utilizando los métodos de deposición descritos en los ejemplos previos. El dispositivo se inserta en una carga de instrumentos estándar y se realiza el proceso habitual. Se extrae el dispositivo al final de proceso y se correlaciona la actividad residual de la fusión de tAK con la eliminación de componentes de contaminación potencialmente infecciosos.

Utilización de la fusión cemento - tAK para monitorizar la eliminación de bioincrustación

[0257] El indicador descrito anteriormente también se puede utilizar para monitorizar la eliminación de bioincrustación en otros contextos. Por ejemplo, el indicador se puede unir a la base de un barco sometido a limpieza para la extracción de percebes y otras biopelículas marinas. El indicador se somete al mismo proceso y se valora al final del procedimiento. Aunque la eliminación visual de material es el medio clave de determinación del rendimiento, la utilización de un método de ensayo más sensible permite una valoración de la eliminación de cantidades microscópicas de contaminación que proporcionaría un mejor cebador para el restablecimiento de la biopelícula marina. Por tanto, en esta aplicación, el indicador proporciona una demostración de eficacia inmediata y una indicación de la longevidad del tratamiento.

Ejemplo 23

Reticulación de tAK a exopolisacárido de *E.coli* o *Staphylococcus aureus*

[0258] El exopolisacárido se genera mediante el crecimiento de la cepa bacteriana relevante bajo condiciones de crecimiento estándar en cultivos líquidos, semilíquidos, biopelículas o sólidos familiares para los expertos en la materia. Las bacterias se recogen, normalmente hacia el final de la fase logarítmica de crecimiento, mediante resuspensión (cuando sea necesario) y centrifugación. Las células se lavan en tampones de fuerza osmótica baja (normalmente por debajo de 100 mM de NaCl/NaPO₄) habitualmente a pH neutro. El lavado se puede llevar a cabo mediante la mezcla vigorosa durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche con agitación suave a 4°C. Opcionalmente, se puede extraer una preparación ácida utilizando un tampón de acetato a pH entre 3 y 5. Se puede conseguir una perturbación celular limitada utilizando sonicación de energía muy baja o mediante la adición de niveles bajos de detergente. Las preparaciones se pueden esterilizar por filtración a través de un filtro de nitrocelulosa o acetato de celulosa de 0,2 µm antes del almacenamiento a 4°C o -20°C.

55 [0259] La reticulación de los polisacáridos a tAK se puede conseguir utilizando un conjunto de químicas de acoplamiento. En el primer ejemplo, se utiliza la tAK de *S.acidocaldarius*. El acoplamiento utiliza el reactivo heterobifuncional ABH (*p*-Azidobenzoil hidrazida; Pierce Chemical, número de producto de la compañía 21510). El protocolo es el siguiente.

60 1. Preparar una solución de peryodato 20 mM mediante la disolución de 4,3 mg de metaperyodato sódico en 1 ml de

acetato de sodio 0,1 M pH 5,5. Almacenar en hielo en la oscuridad.

2. Añadir el 1 ml de solución de metaperyodato a 1 ml del exopolisacárido (EPS; u otra glicoproteína, carbohidrato complejo o solución lipídica) a una concentración de por lo menos 1 mg/ml de carbohidrato. Incubar durante 30 minutos a 4°C.

5 3. Dializar durante la noche contra solución salina tamponada con fosfato

4. Preparar ABH mediante la disolución de 1,8 mg en DMSO.

5. Añadir entre 10 y 100 µl de la ABH a la solución de EPS oxidada generada en la etapa 3 e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas

6. Dializar las muestras durante la noche para eliminar el exceso de ABH

10 7. Mezclar el EPS derivatizada con ABH con tAK purificada de *S.acidocaldarius* preparada tal como se describe previamente. La concentración de la tAK requerida para proporcionar el nivel apropiado de reticulación se puede determinar empíricamente, pero estará normalmente en el intervalo de 1-5 mg/ml. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

8. Exponer la mezcla de reacción a luz UV utilizando un aparato de reticulación UV o equivalente.

15

[0260] En un segundo ejemplo de las químicas disponibles, se utiliza el agente heterobifuncional MPBH clorhidrato de la hidrazida del ácido (4-[4-*N*-maleimidiofenil]butírico; Pierce Chemical, producto de la compañía 22305)). El breve protocolo es el siguiente:

20 1. Se genera tAK (por ejemplo, de *S.acidocladarius*) con un sulfhidrilo reactivo tal como se describe anteriormente mediante la derivatización con SPDP (Ejemplo 10) y la posterior reducción. Alternativamente, se pueden utilizar tAK con residuos cisteína libres (tales como la tAK de *Archaeoglobus fulgidus* expresada en una forma recombinante tal como se describe anteriormente) o con residuos de cisteína adicionales introducidos mediante métodos recombinantes estándar. La proteína se prepara a aproximadamente 1-5 mg/ml de fosfato de sodio 0,1M NaCl 0,15 M pH 7,2 o solución salina tamponada con fosfato.

2. Disolver 3,5 mg MPBH en 1 ml de dimetilformamida o dimetilsulfóxido para producir una solución 10 mM.

3. Añadir a la proteína de la etapa 1 para conseguir un exceso molar de 5-10 veces de MPBH con respecto a la proteína y reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente (o 4 horas a 4°C).

4. Dializar contra fosfato de sodio 0,1 M NaCl 0,15M pH 7,2.

30 5. Preparar una solución de peroyodato 20 mM mediante la disolución de 4,3 mg de metaperyodato sódico en 1 ml de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5. Almacenar en hielo en la oscuridad.

6. Añadir el 1 ml de solución de metaperyodato a 1 ml del exopolisacárido (EPS; u otra glicoproteína, carbohidrato complejo o solución lipídica) a una concentración de por lo menos 1 mg/ml de carbohidrato. Incubar durante 30 minutos a 4°C.

35 7. Dializar durante la noche contra fosfato de sodio 0,1 M NaCl 0,15 M pH 7,2.

8. Mezclar la proteína que contiene sulfhidrilo de la sección 4 con la solución de EPS oxidada de la etapa 7 e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Opcionalmente, separar los componentes reticulados de los componentes libres que aún permanecen utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

40 **[0261]** Los métodos descritos anteriormente son aplicables para generar conjugados de tAK con una amplia gama de carbohidratos complejos, glicoproteínas, glicolípidos y otros polímeros que contienen carbohidratos que incluyen los de origen mamífero, bacteriano, arquea, vegetal o fúngico.

Utilización de indicadores basados en fusiones de exopolisacárido-tAK.

45

[0262] El indicador de EPS-tAK se prepara en un tampón de recubrimiento adecuado, tal como una solución salina tamponada con fosfato (pH 7-7,4), bicarbonato de sodio (pH 9-9,6) o acetato de sodio (pH 4-5,5), que contiene opcionalmente hasta 500 mM de NaCl a una concentración relativamente elevada, por ejemplo, 0,1-2 mg/ml. La solución se deposita sobre un soporte sólido adecuado, tal como acero quirúrgico, plásticos similares a catéteres y recubrimientos, plásticos utilizados habitualmente en endoscopios. La interacción se deja proceder habitualmente durante 1-2 horas a temperatura ambiente y la superficie recubierta se deja secar a temperatura ambiente durante la noche antes del almacenamiento.

50

[0263] Opcionalmente, se pueden añadir otros componentes de la matriz biológica durante la fase de recubrimiento o posterior a la misma.

55

[0264] El indicador se incluye en el proceso a monitorizar, por ejemplo, en un ciclo de lavado-desinfección. El dispositivo se extrae al final del proceso y se inserta en tubos de control de higiene para proporcionar la lectura de la destrucción y/o eliminación eficaz. El proceso se estima eficaz si el valor obtenido está por debajo de los umbrales predeterminados del control de higiene del luminómetro. Si es satisfactorio, el lote de instrumentos o material

60

procesado al mismo tiempo que el indicador se pueden utilizar o pasar al siguiente procesado. Si se estima como insatisfactorio, el material debe reprocesarse con un nuevo dispositivo indicador.

Ejemplo 24

5

Más ejemplos de indicadores de carbohidratos complejos y glicoconjugados

[0265] Se pueden incorporar en los dispositivos indicadores de la invención una amplia gama de moléculas que contienen carbohidratos complejos mediante la unión covalente a tAK utilizando métodos, tales como los indicados anteriormente (Ejemplo 23). Algunos ejemplos adicionales de éstos se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 4: Componentes biológicos que contienen carbohidratos adecuados

Tipo de carbohidrato complejo	Organismos (varias especies y cepas)	Tipo de proceso para aplicaciones de indicadores
EPS/LPS (a veces denominado endotoxina)	Legionella, E.coli, especie Staphylococcus, especie Streptococcus, especie Pseudomonas, Acinetobacter, Shigella, Campylobacter, especie Bacillus,	Limpieza, descontaminación, esterilización, (ejemplos específicos; Eliminación de biopelículas, eliminación o destrucción de endotoxinas, limpieza de instrumentos quirúrgicos, limpieza y descontaminación de productos médicos)
Lignina	Hongos filamentosos	Eliminación y destrucción de biopelículas. Destrucción
Componentes de la pared celular	Streptomyces	Esterilización de suelos
Eap1p y glicoproteínas de la superficie celular equivalentes (Li et al., 2007, Eukaryotic cell, 6, pág 931-939)	Candida albicans y organismos fúngicos relacionados	Eliminación de biopelículas, desocntaminación del control de la infección
Extractos de esporas	Especie Bacillus, especie Clostridial; otros formadores de esporas	Esterilización de productos, limpieza y descontaminación de habitación
Preparaciones de mucina	Especies de mamíferos y cultivos celulares recombinantes	Descontaminación de instrumentos quirúrgicos, descontaminación de máscaras quirúrgicas, control de brotes de virus respiratorio (por ejemplo, gripe, RSV)
Glicolípidos derivados del cerebro	Especies de mamíferos	Evaluación/validación de tecnologías de eliminación de priones, descontaminación de instrumentos neurológicos, muestras, etc.
Secreciones de invertebrados	Geles de moluscos	Eliminación de bioincrustación
Hidrocaburos, gomas, resinas, aceites o lípidos de plantas	Varias especies de plantas	Eliminación o destrucción de materiales contaminantes en superficies o en productos

Ejemplo 25

15

Acoplamiento de tAK a moco para validar procesos diseñados para reducir la contaminación por mocos de productos médicos

[0266] El moco se purifica de una línea celular productora de moco, tal como células bronquiales humanas normales, células cultivadas o se recoge de muestras de esputo de pacientes. El lavado en agua o soluciones bajas en sales es suficiente para separar la mucina de la mayoría de otros componentes. Alternativamente, también se

20

puede utilizar la mucina purificada de origen animal, por ejemplo, mucina porcina. La preparación purificada se reticula a tAK utilizando los métodos descritos anteriormente, al componente proteico, a través del acoplamiento con SPDP de las proteínas tal como se muestra en la figura 7, o al componente carbohidrato utilizando los métodos específicos establecidos en el ejemplo 23. La deposición posterior utilización del indicador es tal como se describe en los ejemplos 23 y 24. La figura 8 muestra los resultados de la utilización de un conjugado de tAK-mucina para monitorizar la eliminación de mucina en un dispositivo de lavado-desinfección.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0267]

<110> Health Protection Agency
Sutton, J. Mark
Hesp, J. Richard
Ungurs, Michael

<120> Indicador biológico reticulado

<130> P30041WO-MRM

<150> GB 0803068.6

<151> 2008-02-20

<160> 77

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> Sulfolobus solfataricus

<400> 1

```

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Thr Thr
1      5      10      15
Val Leu Ser Phe Ala Asp Lys Ile Leu Thr Glu Lys Gly Ile Ser His
      20      25      30
Lys Ile Val Asn Tyr Gly Asp Tyr Met Leu Asn Thr Ala Leu Lys Glu
      35      40      45
Gly Tyr Val Lys Ser Arg Asp Glu Ile Arg Lys Leu Gln Ile Glu Lys
      50      55      60
Gln Arg Glu Leu Gln Ala Leu Ala Ala Arg Arg Ile Val Glu Asp Leu
      65      70      75      80
Ser Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ile Gly Leu Ile Asp Thr His Ala Val
      85      90      95
Ile Arg Thr Pro Ala Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Arg His Val Ile
      100      105      110
Glu Val Leu Ser Pro Lys Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys
      115      120      125
Ile Ile Leu Glu Arg Gln Lys Arg Asp Ser Ser Arg Ala Arg Thr Asp
      130      135      140
Tyr Ser Asp Thr Ala Val Ile Asn Glu Val Ile Gln Phe Ala Arg Tyr
      145      150      155      160
Ser Ala Met Ala Ser Ala Val Leu Val Gly Ala Ser Val Lys Val Val
      165      170      175
Val Asn Gln Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Ser Glu Ile Ile Asn
      180      185      190
Ser Leu Met
      195
    
```

<210> 2

<211> 194

ES 2 398 018 T3

<212> PRT

<213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 2

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn
 20 25 30
 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
 50 55 60
 Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95
 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110
 Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile
 115 120 125
 Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
 130 135 140
 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
 165 170 175
 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
 180 185 190
 Met Lys

<210> 3

<211> 197

<212> PRT

<213> Sulfolobus tokodaii

<400> 3

Met Ser Lys Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly
 1 5 10 15
 Lys Thr Thr Val Leu Ser Lys Val Lys Glu Ile Leu Glu Glu Lys Lys
 20 25 30
 Ile Asn Asn Lys Ile Val Asn Tyr Gly Asp Tyr Met Leu Met Thr Ala
 35 40 45
 Met Lys Leu Gly Tyr Val Asn Asn Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro
 50 55 60
 Val Glu Lys Gln Lys Gln Leu Gln Ile Glu Ala Ala Arg Gly Ile Ala
 65 70 75 80
 Asn Glu Ala Lys Glu Gly Gly Asp Gly Leu Leu Phe Ile Asp Thr His
 85 90 95
 Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Lys Tyr
 100 105 110
 Val Ile Glu Glu Ile Asn Pro Arg Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp
 115 120 125
 Pro Lys Val Ile Leu Asp Arg Gln Lys Arg Asp Thr Ser Arg Ser Arg
 130 135 140
 Ser Asp Tyr Ser Asp Glu Arg Ile Ile Ser Glu Thr Ile Asn Phe Ala
 145 150 155 160
 Arg Tyr Ala Ala Met Ala Ser Ala Val Leu Val Gly Ala Thr Val Lys
 165 170 175
 Ile Val Ile Asn Val Glu Gly Asp Pro Ala Val Ala Ala Asn Glu Ile
 180 185 190
 Ile Asn Ser Met Leu
 195

<210> 4

ES 2 398 018 T3

<211> 196
 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 4

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys Ala Lys Phe Arg Leu
 20 25 30
 Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu
 35 40 45
 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Lys Ile Gln Arg
 50 55 60
 Glu Leu Gln Met Lys Ala Ala Lys Lys Ile Thr Thr Glu Met Ala Lys Glu
 65 70 75 80
 His Pro Ile Leu Val Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 85 90 95
 Tyr Met Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Val Lys Thr Leu Asn Pro Asn
 100 105 110
 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 115 120 125
 Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130 135 140
 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Ala Tyr Ala Met
 145 150 155 160
 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 Asn Glu Tyr Ala
 195

<210> 5
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus horikoshii*

<400> 5

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln Arg Thr Arg Ala Lys Phe Lys Leu
 20 25 30
 Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Leu Lys Leu Lys Leu
 35 40 45
 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Val Gln Arg
 50 55 60
 Glu Leu Gln Met Asn Ala Ala Lys Lys Ile Ala Glu Met Ala Lys Asn
 65 70 75 80
 Tyr Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 85 90 95
 Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn
 100 105 110
 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 115 120 125
 Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130 135 140
 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Thr Tyr Ala Met
 145 150 155 160
 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Ala
 195

ES 2 398 018 T3

<210> 6
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus abyssi

<400> 6

```

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1      5      10      15
Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys Ala Lys Phe Lys Leu
 20      25      30
Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu
 35      40      45
Val Asn His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Ile Gln Arg
 50      55      60
Asp Leu Gln Met Lys Val Ala Lys Lys Ile Ser Glu Met Ala Arg Gln
 65      70      75      80
Gln Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 85      90      95
Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Thr Leu Asn Pro Asn
 100     105     110
Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 115     120     125
Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130     135     140
Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ile Ala Tyr Ala Met
 145     150     155     160
His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165     170     175
Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Glu Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180     185     190
Lys Glu Tyr Ala
 195
    
```

<210> 7
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanococcus thermolithotrophicus

<400> 7

```

Met Lys Asn Lys Leu Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly
 1      5      10      15
Thr Thr Ile Thr Gln Lys Ala Met Glu Lys Leu Ser Glu Glu Gly Ile
 20      25      30
Asn Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Gln
 35      40      45
Glu Glu Asn Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro
 50      55      60
Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65      70      75      80
Met Val Lys Glu Ser Pro Val Val Val Asp Thr His Ser Thr Ile Lys
 85      90      95
Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Val Trp Val Leu Asn Glu
 100     105     110
Leu Asn Pro Asp Ile Ile Ile Val Val Glu Thr Ser Gly Asp Glu Ile
 115     120     125
Leu Ile Arg Arg Leu Asn Asp Glu Thr Arg Asn Arg Asp Leu Glu Thr
 130     135     140
Thr Ala Gly Ile Glu Glu His Gln Ile Met Asn Arg Ala Ala Ala Met
 145     150     155     160
Thr Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Gln Asn Lys
 165     170     175
Asn Asn Leu Leu Asp Tyr Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Arg
 180     185     190
    
```

ES 2 398 018 T3

<210> 8
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanococcus voltae

<400> 8

Met Lys Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ser
 1 5 10 15
 Thr Thr Ser Ser Gln Leu Ala Met Asp Asn Leu Arg Lys Glu Gly Val
 20 25 30
 Asn Tyr Lys Met Val Ser Phe Gly Ser Val Met Phe Glu Val Ala Lys
 35 40 45
 Glu Glu Asn Leu Val Ser Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Met Asp Pro
 50 55 60
 Glu Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Met Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 Met Ala Lys Glu Ser Pro Val Ala Val Asp Thr His Ser Thr Val Ser
 85 90 95
 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Trp Val Leu Asn Glu
 100 105 110
 Leu Asn Pro Asp Leu Ile Ile Val Glu Thr Thr Gly Asp Glu Ile
 115 120 125
 Leu Met Arg Arg Met Ser Asp Glu Thr Arg Val Arg Asp Leu Asp Thr
 130 135 140
 Ala Ser Thr Ile Glu Gln His Gln Phe Met Asn Arg Cys Ala Ala Met
 145 150 155 160
 Ser Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Val Gln Asn Arg
 165 170 175
 Asn Gly Leu Leu Asp Gln Ala Val Glu Glu Leu Thr Asn Val Leu Arg
 180 185 190

<210> 9
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Methanococcus jannaschii

<400> 9

Met Met Met Met Lys Asn Lys Val Val Val Ile Val Gly Val Pro Gly
 1 5 10 15
 Val Gly Ser Thr Thr Val Thr Asn Lys Ala Ile Glu Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Glu Gly Ile Glu Tyr Lys Ile Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu
 35 40 45
 Ile Ala Lys Glu Glu Gly Leu Val Glu His Arg Asp Gln Leu Arg Lys
 50 55 60
 Leu Pro Pro Glu Glu Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Ala Glu Met Ala Lys Glu Phe Asn Ile Val Val Asp Thr His Ser
 85 90 95
 Thr Ile Lys Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ala Trp Val
 100 105 110
 Leu Glu Glu Leu Asn Pro Asp Ile Ile Val Leu Val Glu Ala Glu Asn
 115 120 125
 Asp Glu Ile Leu Met Arg Arg Leu Lys Asp Glu Thr Arg Gln Arg Asp
 130 135 140
 Phe Glu Ser Thr Glu Asp Ile Gly Glu His Ile Phe Met Asn Arg Cys
 145 150 155 160
 Ala Ala Met Thr Tyr Ala Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile
 165 170 175
 Lys Asn Arg Asp Phe Leu Leu Asp Lys Ala Val Gln Glu Leu Ile Glu
 180 185 190
 Val Leu Lys
 195

ES 2 398 018 T3

<210> 10
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Methanopyrus kandleri

<400> 10

Met Gly Tyr Val Ile Val Ala Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Ala Thr
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Thr Glu Ala Val Lys Glu Leu Glu Gly Tyr Glu His Val
 20 25 30
 Asn Tyr Gly Asp Val Met Leu Glu Ile Ala Lys Glu Glu Gly Leu Val
 35 40 45
 Glu His Arg Asp Glu Ile Arg Lys Leu Pro Ala Glu Lys Gln Arg Glu
 50 55 60
 Ile Gln Arg Leu Ala Ala Arg Arg Ile Ala Lys Met Ala Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Glu Gly Ile Ile Val Asp Thr His Cys Thr Ile Lys Thr Pro Ala Gly
 85 90 95
 Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ile Trp Val Leu Glu Glu Leu Gln Pro Asp
 100 105 110
 Val Ile Val Leu Ile Glu Ala Asp Pro Asp Glu Ile Met Met Arg Arg
 115 120 125
 Val Lys Asp Ser Glu Glu Arg Gln Arg Asp Tyr Asp Arg Ala His Glu
 130 135 140
 Ile Glu Glu His Gln Lys Met Asn Arg Met Ala Ala Met Ala Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Glu Asn His Asp Asp Arg
 165 170 175
 Leu Glu Glu Ala Val Arg Glu Phe Val Glu Thr Val Arg Ser Leu
 180 185 190

<210> 11
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Methanotorris igneus

<400> 11

Met Lys Asn Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro Gly Val Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Leu Thr Gln Lys Thr Ile Glu Lys Leu Lys Glu Glu Gly Ile
 20 25 30
 Glu Tyr Lys Met Val Asn Phe Gly Thr Val Met Phe Glu Val Ala Lys
 35 40 45
 Glu Glu Gly Leu Val Glu Asp Arg Asp Gln Met Arg Lys Leu Asp Pro
 50 55 60
 Asp Thr Gln Lys Arg Ile Gln Lys Leu Ala Gly Arg Lys Ile Ala Glu
 65 70 75 80
 Met Ala Lys Glu Ser Asn Val Ile Val Asp Thr His Ser Thr Val Lys
 85 90 95
 Thr Pro Lys Gly Tyr Leu Ala Gly Leu Pro Ile Trp Val Leu Glu Glu
 100 105 110
 Leu Asn Pro Asp Ile Ile Val Ile Val Glu Thr Ser Ser Asp Glu Ile
 115 120 125
 Leu Met Arg Arg Leu Gly Asp Ala Thr Arg Asn Arg Asp Ile Glu Leu
 130 135 140
 Thr Ser Asp Ile Asp Glu His Gln Phe Met Asn Arg Cys Ala Ala Met
 145 150 155 160
 Ala Tyr Gly Val Leu Thr Gly Ala Thr Val Lys Ile Ile Lys Asn Arg
 165 170 175
 Asp Gly Leu Leu Asp Lys Ala Val Glu Glu Leu Ile Ser Val Leu Lys
 180 185 190

ES 2 398 018 T3

<210> 12
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> *Pyrobaculum aerophilum*

<400> 12

Met Lys Ile Val Ile Val Ala Leu Pro Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile
 1 5 10 15
 Leu Asn Phe Val Lys Gl n Lys Leu Pro Asp Val Lys Ile Val Asn Tyr
 20 30
 Gly Asp Val Met Leu Gl u Ile Ala Lys Lys Arg Phe Gly Ile Gl n His
 35 40 45
 Arg Asp Gl u Met Arg Lys Lys Ile Pro Val Asp Gl u Tyr Arg Lys Val
 50 55 60
 Gl n Gl u Gl u Ala Ala Gl u Tyr Ile Ala Ser Leu Thr Gly Asp Val Ile
 65 70 75 80
 Ile Asp Thr His Ala Ser Ile Lys Ile Gly Gl y Gl y Tyr Tyr Pro Gly
 85 90 95
 Leu Pro Asp Arg Ile Ile Ser Lys Leu Lys Pro Asp Val Ile Leu Leu
 100 105 110
 Leu Gl u Tyr Asp Pro Lys Val Ile Leu Gl u Arg Arg Lys Lys Asp Pro
 115 120 125
 Asp Arg Phe Arg Asp Leu Gl u Ser Gl u Gl u Gl u Ile Gl u Met His Gl n
 130 135 140
 Gl n Ala Asn Arg Tyr Tyr Ala Phe Ala Ala Asn Ala Gly Gl u Ser
 145 150 155 160
 Thr Val His Val Leu Asn Phe Arg Gly Lys Pro Gl u Ser Arg Pro Phe
 165 170 175
 Gl u His Ala Gl u Val Ala Ala Gl u Tyr Ile Val Asn Leu Ile Leu Arg
 180 185 190
 Thr Arg Gl n Lys Ser
 195

<210> 13
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> *Thermotoga maritima*

<400> 13

Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Ala Lys Arg Ile Gl n Gl u Lys Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
 20 25 30
 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Gl u Asn Asp Gl u Leu
 35 40 45
 Gly Lys Lys Ile Lys Gl u Ile Met Gl u Lys Gly Gl u Leu Val Pro Asp
 50 55 60
 Gl u Leu Val Asn Gl u Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Gl u Lys Asp Cys
 65 70 75 80
 Gl u Lys Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gl n Ala
 85 90 95
 Gl u Phe Leu Asp Ser Phe Leu Gl u Ser Gl n Asn Lys Gl n Leu Thr Ala
 100 105 110
 Ala Val Leu Phe Asp Val Pro Gl u Asp Val Val Val Gl n Arg Leu Thr
 115 120 125
 Ser Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Met Ile Ser
 130 135 140
 Leu Pro Pro Lys Gl u Asp Gl u Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
 145 150 155 160
 Val Gl n Arg Asp Asp Lys Gl u Gl u Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
 165 170 175
 Val Tyr Leu Gl u Lys Thr Gl n Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Gly Lys Lys
 180 185 190

ES 2 398 018 T3

Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Val
 195 200 205
 Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 210 215 220

<210> 14
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Aeropyrum pernix

<400> 14

Met Lys Val Arg His Pro Phe Lys Val Val Val Val Thr Gly Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Val Gly Lys Thr Thr Val Ile Lys Glu Leu Gln Gly Leu Ala Glu
 20 25 30
 Lys Glu Gly Val Lys Leu His Ile Val Asn Phe Gly Ser Phe Met Leu
 35 40 45
 Asp Thr Ala Val Lys Leu Gly Leu Val Glu Asp Arg Asp Lys Ile Arg
 50 55 60
 Thr Leu Pro Leu Arg Arg Gln Leu Glu Leu Gln Arg Glu Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Arg Ile Val Ala Glu Ala Ser Lys Ala Leu Gly Gly Asp Gly Val Leu
 85 90 95
 Ile Ile Asp Thr His Ala Leu Val Lys Thr Val Ala Gly Tyr Trp Pro
 100 105
 Gly Leu Pro Lys His Val Leu Asp Glu Leu Lys Pro Asp Met Ile Ala
 115 120 125
 Val Val Glu Ala Ser Pro Glu Glu Val Ala Ala Arg Gln Ala Arg Asp
 130 135 140
 Thr Thr Arg Tyr Arg Val Asp Ile Gly Gly Val Glu Gly Val Lys Arg
 145 150 155 160
 Leu Met Glu Asn Ala Arg Ala Ala Ser Ile Ala Ser Ala Ile Gln Tyr
 165 170 175
 Ala Ser Thr Val Ala Ile Val Glu Asn Arg Glu Gly Glu Ala Ala Lys
 180 185 190
 Ala Ala Glu Glu Leu Leu Arg Leu Ile Lys Asn Leu
 195 200

<210> 15
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Archaeoglobus fulgidus

<400> 15

Met Asn Leu Ile Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Gln
 1 5 10 15
 Ala Lys Arg Val Ser Glu Lys Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Ser Thr Gly
 20 25 30
 Asp Met Leu Arg Glu Ala Val Ala Lys Gly Thr Glu Leu Gly Lys Lys
 35 40 45
 Ala Lys Glu Tyr Met Asp Lys Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Val Val
 50 55 60
 Ile Gly Ile Val Lys Glu Arg Leu Gln Gln Pro Asp Cys Glu Lys Gly
 65 70 75 80
 Phe Ile Leu Asp Gly Phe Pro Arg Thr Leu Ala Gln Ala Glu Ala Leu
 85 90 95
 Asp Glu Met Leu Lys Glu Leu Asn Lys Lys Ile Asp Ala Val Ile Asn
 100 105 110
 Val Val Val Pro Glu Glu Glu Val Val Lys Arg Ile Thr Tyr Arg Arg
 115 120 125
 Thr Cys Arg Asn Cys Gly Ala Val Tyr His Leu Ile Tyr Ala Pro Pro
 130 135 140

ES 2 398 018 T3

Lys Glu Asp Asn Lys Cys Asp Lys Cys Gly Gly Glu Leu Tyr Gl n Arg
 145 150 160
 Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg Glu Arg Tyr Arg Val Tyr Lys Gl n
 165 170 175
 Asn Thr Glu Pro Leu Ile Asp Tyr Tyr Arg Lys Lys Gly Ile Leu Tyr
 180 185 190
 Asp Val Asp Gly Thr Lys Asp Ile Glu Gly Val Trp Lys Glu Ile Glu
 195 200 205
 Ala Ile Leu Glu Lys Ile Lys Ser
 210 215

<210> 16
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus abyssi

<400> 16

Met Asn Ile Leu Ile Phe Gly Pro Pro Gly Ser Gly Lys Ser Thr Gl n
 1 5 10 15
 Ala Arg Arg Ile Thr Glu Arg Tyr Gly Leu Thr Tyr Ile Ala Ser Gly
 20 25 30
 Asp Ile Ile Arg Ala Glu Ile Lys Ala Arg Thr Pro Leu Gly Ile Glu
 35 40 45
 Met Glu Arg Tyr Leu Ser Arg Gly Asp Leu Ile Pro Asp Thr Ile Val
 50 55 60
 Asn Thr Leu Ile Ile Ser Lys Leu Arg Arg Val Arg Glu Asn Phe Ile
 65 70 75 80
 Met Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Pro Glu Gl n Val Ile Thr Leu Glu Asn
 85 90 95
 Tyr Leu Tyr Asp His Gly Ile Lys Leu Asp Val Ala Ile Asp Ile Tyr
 100 105 110
 Ile Thr Lys Glu Glu Ser Val Arg Arg Ile Ser Gly Arg Arg Ile Cys
 115 120 125
 Ser Lys Cys Gly Ala Val Tyr His Val Glu Phe Asn Pro Pro Lys Val
 130 135 140
 Pro Gly Lys Cys Asp Ile Cys Gly Gly Glu Leu Ile Gl n Arg Pro Asp
 145 150 155 160
 Asp Arg Pro Glu Ile Val Glu Lys Arg Tyr Asp Ile Tyr Ser Lys Asn
 165 170 175
 Met Glu Pro Ile Ile Lys Phe Tyr Gl n Lys Gl n Gly Ile Tyr Val Arg
 180 185 190
 Ile Asp Gly His Gly Ser Ile Asp Glu Val Trp Glu Arg Ile Arg Pro
 195 200 205
 Leu Leu Asp Tyr Ile Tyr Asn Gl n Glu Asn Arg Arg
 210 215 220

<210> 17
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Síntetica

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (61)..(61)
 <223> El aminoácido "X" puede ser K o E.

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (75)..(75)
 <223> El aminoácido "X" puede ser T o A.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (98)..(98)
 <223> El aminoácido "X" puede ser M o L.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (157)..(157)
 <223> El aminoácido "X" puede ser A, o un residuo hidrófobo pequeño (por ejemplo, I o L) o un residuo hidrófobo grande (por ejemplo, F), que incrementa la estabilidad térmica de la enzima.

<400> 17

```

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
1      5      10     15
Thr Ile Thr Arg Leu Ala Leu Gln Arg Thr Lys Ala Lys Phe Arg Leu
20     25     30
Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Val Lys Ala Gly Leu
35     40     45
Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Xaa Ile Gln Arg
50     55     60
Glu Leu Gln Met Lys Ala Ala Lys Lys Ile Xaa Glu Met Ala Lys Glu
65     70     75     80
His Pro Ile Leu Val Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
85     90     95
Tyr Xaa Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Val Lys Thr Leu Asn Pro Asn
100    105    110
Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
115    120    125
Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
130    135    140
Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Xaa Tyr Ala Met
145    150    155    160
His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
165    170    175
Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
180    185    190
Asn Glu Tyr Ala
195
    
```

<210> 18
 <211> 196
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Síntetica

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> El aminoácido "X" puede ser G, o puede ser cualquier otro residuo que incrementa la estabilidad térmica de la enzima.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (157)..(157)
 <223> El aminoácido "X" puede ser A, o un residuo hidrófobo pequeño (por ejemplo, I o L) o un residuo hidrófobo

ES 2 398 018 T3

grande (por ejemplo, F), que incrementa la estabilidad térmica de la enzima.

<400> 18

Met Pro Phe Val Val Ile Ile Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Ile Thr Lys Leu Ala Leu Gln Arg Thr Arg Ala Lys Phe Lys Leu
 20 25 30
 Ile Asn Phe Gly Asp Leu Met Phe Glu Glu Ala Leu Lys Leu Xaa Leu
 35 40 45
 Val Lys His Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Pro Leu Glu Val Gln Arg
 50 55 60
 Glu Leu Gln Met Asn Ala Lys Lys Ile Ala Glu Met Ala Lys Asn
 65 70 75
 Tyr Pro Ile Leu Leu Asp Thr His Ala Thr Ile Lys Thr Pro His Gly
 85 90 95
 Tyr Leu Leu Gly Leu Pro Tyr Glu Val Ile Lys Ile Leu Asn Pro Asn
 100 105 110
 Phe Ile Val Ile Ile Glu Ala Thr Pro Ser Glu Ile Leu Gly Arg Arg
 115 120 125
 Leu Arg Asp Leu Lys Arg Asp Arg Asp Val Glu Thr Glu Glu Gln Ile
 130 135 140
 Gln Arg His Gln Asp Leu Asn Arg Ala Ala Ala Ile Xaa Tyr Ala Met
 145 150 155 160
 His Ser Asn Ala Leu Ile Lys Ile Ile Glu Asn His Glu Asp Lys Gly
 165 170 175
 Leu Glu Glu Ala Val Asn Glu Leu Val Lys Ile Leu Asp Leu Ala Val
 180 185 190
 Lys Glu Tyr Ala
 195

<210> 19

<211> 194

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (103)..(103)

<223> El aminoácido "X" puede ser A o M.

<400> 19

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn
 20 25 30
 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
 50 55 60
 Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Gly Gly Glu Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95
 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Xaa Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110
 Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile
 115 120 125
 Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
 130 135 140
 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala

ES 2 398 018 T3

145 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
 165 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
 180 Met Lys 185 190 155

<210> 20
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Thermotoga maritima

<400> 20

Met Arg Val Leu Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Glu
 1 5 10 15
 Leu Ile Glu Met Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu
 20 25 30
 Arg Ile Gly Ile Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu
 35 40 45
 Lys His Val Ile Glu Arg Glu Leu Pro Asp His Glu Glu Ala Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ile Leu Asn Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Lys Glu Ile Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu
 85 90 95
 Arg Phe Lys Glu Ser Val Leu Val Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile
 100 105 110
 Glu Glu Val Ser Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met
 115 120 125
 Gly Ile Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala
 130 135 140
 Val Phe Asp Thr Ala Phe His Glu Thr Ile Pro Glu Lys Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Ile Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr
 165 170 175
 Gly Phe His Gly Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Glu
 180 185 190
 Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gly Ala Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp
 210 215 220
 Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Val Met Gly Thr Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Ile Ser Pro Glu Glu Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly
 260 265 270
 Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Glu
 275 280 285
 Glu Ala Ala Leu Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile
 290 295 300
 Tyr Asp Tyr Arg Ile Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met
 305 310 315 320
 Asn Gly Val Asp Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ser
 325 330 335
 Pro Ile Thr Arg Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val
 340 345 350
 Lys Leu Asp Lys Glu Lys Asn Glu Glu Thr Ile Arg Gly Lys Glu Gly
 355 360 365
 Ile Ile Ser Thr Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr
 370 375 380
 Asn Glu Glu Leu Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys
 385 390 395 400
 Ile Gly Arg

<210> 21

ES 2 398 018 T3

<211> 478
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus horikoshii

<400> 21

Met Arg Arg Met Lys Leu Pro Ser His Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Pro Ala Thr Asn Ser Lys Lys Met Ile Lys Lys Leu Ile Glu
 20 25 30
 Ala Gly Met Asn Val Ala Arg Ile Asn Phe Ser His Gly Thr Phe Glu
 35 40 45
 Glu His Ala Lys Ile Ile Glu Met Val Arg Glu Gln Ser Gln Lys Leu
 50 55 60
 Asp Arg Arg Val Ala Ile Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Gly Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Glu Leu Glu Arg Gly Glu Lys
 85 90 95
 Val Thr Leu Thr Thr Lys Asp Ile Glu Gly Asp Glu Thr Thr Ile Pro
 100 105 110
 Val Glu Tyr Lys Asp Phe Pro Lys Leu Val Ser Lys Gly Asp Val Ile
 115 120 125
 Tyr Leu Ser Asp Gly Tyr Ile Val Leu Arg Val Glu Asp Val Lys Glu
 130 135 140
 Asn Glu Val Glu Ala Val Val Ile Ser Gly Gly Lys Leu Phe Ser Arg
 145 150 155 160
 Lys Gly Ile Asn Ile Pro Lys Ala Tyr Leu Pro Val Glu Ala Ile Thr
 165 170 175
 Pro Arg Asp Ile Glu Ile Met Lys Phe Ala Ile Glu His Gly Val Asp
 180 185 190
 Ala Ile Gly Leu Ser Phe Val Gly Asn Val Tyr Asp Val Leu Lys Ala
 195 200 205
 Lys Ser Phe Leu Glu Arg Asn Gly Ala Gly Asp Thr Phe Val Ile Ala
 210 215 220
 Lys Ile Glu Arg Pro Asp Ala Val Arg Asn Phe Asn Glu Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Gly Ile Met Ile Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Met
 245 250 255
 Pro Ile Glu Gln Leu Pro Ile Leu Gln Lys Arg Leu Ile Arg Lys Ala
 260 265 270
 Asn Met Glu Gly Lys Pro Val Ile Thr Ala Thr Gln Met Leu Val Ser
 275 280 285
 Met Thr Met Glu Lys Val Pro Thr Arg Ala Glu Val Thr Asp Val Ala
 290 295 300
 Asn Ala Ile Leu Asp Gly Thr Asp Ala Val Met Leu Ser Glu Glu Thr
 305 310 315 320
 Ala Val Gly Lys Phe Pro Ile Glu Ala Val Glu Met Met Ala Arg Ile
 325 330 335
 Ala Lys Val Thr Glu Glu Tyr Arg Glu Ser Phe Gly Ile Thr Arg Met
 340 345 350
 Arg Glu Phe Leu Glu Gly Thr Lys Arg Gly Thr Ile Lys Glu Ala Ile
 355 360 365
 Thr Arg Ser Ile Ile Asp Ala Ile Cys Thr Ile Gly Ile Lys Phe Ile
 370 375 380
 Leu Thr Pro Thr Lys Thr Gly Arg Thr Ala Arg Leu Ile Ser Arg Phe
 385 390 395 400
 Lys Pro Lys Gln Trp Ile Leu Ala Phe Ser Thr Arg Glu Lys Val Cys
 405 410 415
 Asn Asn Leu Met Phe Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Phe Cys Met Glu Glu
 420 425 430
 Gly Phe Asn Glu Asn Asp Ile Val Arg Leu Ile Lys Gly Leu Gly Leu
 435 440 445
 Val Gly Ser Asp Asp Ile Val Leu Met Thr Glu Gly Lys Pro Ile Glu
 450 455 460
 Lys Thr Val Gly Thr Asn Ser Ile Lys Ile Phe Gln Ile Ala
 465 470 475

<210> 22

ES 2 398 018 T3

<211> 452
 <212> PRT
 <213> Sulfolobus solfataricus

<400> 22

Met Arg Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr Leu Gly Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Lys Val Lys Glu Leu Ala Glu Tyr Val Asp Val Phe Arg Ile Asn Phe
 20 25 30
 Ala His Gly Asp Glu Thr Ser His Arg Lys Tyr Phe Asp Leu Ile Arg
 35 40 45
 Thr Tyr Ala Pro Glu Ser Ser Ile Ile Val Asp Leu Pro Gly Pro Lys
 50 55 60
 Leu Arg Leu Gly Glu Leu Lys Glu Pro Ile Glu Val Lys Lys Gly Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Val Phe Ser Glu Lys Asp Gly Ile Pro Val Asp Asp Glu Leu
 85 90 95
 Phe Tyr Ser Ala Val Lys Glu Asn Ser Asp Ile Leu Ile Ala Asp Gly
 100 105 110
 Thr Ile Arg Val Arg Val Lys Ser Lys Ala Lys Asp Arg Val Glu Gly
 115 120 125
 Thr Val Ile Glu Gly Gly Ile Leu Leu Ser Arg Lys Gly Ile Asn Ile
 130 135 140
 Pro Asn Val Asn Leu Lys Ser Gly Ile Thr Asp Asn Asp Leu Lys Leu
 145 150 155 160
 Leu Lys Arg Ala Leu Asp Leu Gly Ala Asp Tyr Ile Gly Leu Ser Phe
 165 170 175
 Val Ile Ser Glu Asn Asp Val Lys Lys Val Lys Glu Phe Val Gly Asp
 180 185 190
 Glu Ala Trp Val Ile Ala Lys Ile Glu Lys Ser Glu Ala Leu Lys Asn
 195 200 205
 Leu Thr Asn Ile Val Asn Glu Ser Asp Gly Ile Met Val Ala Arg Gly
 210 215 220
 Asp Leu Gly Val Glu Thr Gly Leu Glu Asn Leu Pro Leu Ile Glu Arg
 225 230 235 240
 Arg Ile Val Arg Thr Ser Arg Val Phe Gly Lys Pro Val Ile Leu Ala
 245 250 255
 Thr Glu Val Leu Thr Ser Met Ile Asn Ser Pro Ile Pro Thr Arg Ala
 260 265 270
 Glu Ile Ile Asp Ile Ser Asn Ser Ile Met Glu Gly Val Asp Ser Ile
 275 280 285
 Met Leu Ser Asp Glu Thr Ala Ile Glu Asn Tyr Pro Val Glu Ser Val
 290 295 300
 Arg Thr Leu His Asn Ile Ile Ser Asn Val Glu Lys Ser Val Lys His
 305 310 315 320
 Arg Pro Ile Gly Pro Leu Asn Ser Glu Ser Asp Ala Ile Ala Leu Ala
 325 330 335
 Ala Val Asn Ala Ser Lys Val Ser Lys Ala Asp Val Ile Val Val Tyr
 340 345 350
 Ser Arg Ser Gly Asn Ser Ile Leu Arg Val Ser Arg Leu Arg Pro Glu
 355 360 365
 Arg Asn Ile Ile Gly Val Ser Pro Asp Pro Arg Leu Ala Lys Lys Phe
 370 375 380
 Lys Leu Cys Tyr Gly Val Ile Pro Ile Ser Ile Asn Lys Lys Met Glu
 385 390 395 400
 Ser Ile Asp Glu Ile Ile Asp Val Ser Ala Lys Leu Met Glu Glu Lys
 405 410 415
 Ile Lys Asp Leu Lys Phe Lys Lys Ile Val Ile Val Gly Gly Asp Pro
 420 425 430
 Lys Glu Glu Ala Gly Lys Thr Asn Phe Val Ile Val Lys Thr Leu Glu
 435 440 445
 Glu Glu Lys Lys
 450

<210> 23
 <211> 466
 <212> PRT

ES 2 398 018 T3

<213> Thermotoga maritima

<400> 23

Met Arg Ser Thr Lys Ile Val Cys Thr Val Gly Pro Arg Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 Tyr Glu Met Ile Glu Lys Met Ile Asp Leu Gly Val Asn Val Phe Arg
 20 25 30
 Ile Asn Thr Ser His Gly Asp Trp Asn Glu Gln Glu Gln Lys Ile Leu
 35 40 45
 Lys Ile Lys Asp Leu Arg Glu Lys Lys Lys Pro Val Ala Ile Leu
 50 55 60
 Ile Asp Leu Ala Gly Pro Lys Ile Arg Thr Gly Tyr Leu Glu Lys Glu
 65 70 75
 Phe Val Glu Leu Lys Glu Gly Gln Ile Phe Thr Leu Thr Thr Lys Glu
 80 85 90 95
 Ile Leu Gly Asn Glu His Ile Val Ser Val Asn Leu Ser Ser Leu Pro
 100 105
 Lys Asp Val Lys Lys Gly Asp Thr Ile Leu Leu Ser Asp Gly Glu Ile
 110 115 120 125
 Val Leu Glu Val Ile Glu Thr Thr Asp Thr Glu Val Lys Thr Val Val
 130 135 140
 Lys Val Gly Gly Lys Ile Thr His Arg Arg Gly Val Asn Val Pro Thr
 145 150 155 160
 Ala Asp Leu Ser Val Glu Ser Ile Thr Asp Arg Asp Arg Glu Phe Ile
 165 170 175
 Lys Leu Gly Thr Leu His Asp Val Glu Phe Phe Ala Leu Ser Phe Val
 180 185 190
 Arg Lys Pro Glu Asp Val Leu Lys Ala Lys Glu Glu Ile Arg Lys His
 195 200 205
 Gly Lys Glu Ile Pro Val Ile Ser Lys Ile Glu Thr Lys Lys Ala Leu
 210 215 220
 Glu Arg Leu Glu Glu Ile Ile Lys Val Ser Asp Gly Ile Met Val Ala
 225 230 235 240
 Arg Gly Asp Leu Gly Val Glu Ile Pro Ile Glu Glu Val Pro Ile Val
 245 250 255
 Gln Lys Glu Ile Ile Lys Leu Ser Lys Tyr Tyr Ser Lys Pro Val Ile
 260 265 270
 Val Ala Thr Gln Ile Leu Glu Ser Met Ile Glu Asn Pro Phe Pro Thr
 275 280 285
 Arg Ala Glu Val Thr Asp Ile Ala Asn Ala Ile Phe Asp Gly Ala Asp
 290 295 300
 Ala Leu Leu Leu Thr Ala Glu Thr Ala Val Gly Lys His Pro Leu Glu
 305 310 315 320
 Ala Ile Lys Val Leu Ser Lys Val Ala Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu
 325 330 335
 Glu Phe Phe Arg Thr Ile Glu Tyr Asp Thr Ser Asp Ile Ser Glu Ala
 340 345 350
 Ile Ser His Ala Cys Trp Gln Leu Ser Glu Ser Leu Asn Ala Lys Leu
 355 360 365
 Ile Ile Thr Pro Thr Ile Ser Gly Ser Thr Ala Val Arg Val Ser Lys
 370 375 380
 Tyr Asn Val Ser Gln Pro Ile Val Ala Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr
 385 390 395 400
 Tyr Tyr Arg Leu Ser Leu Val Arg Lys Val Ile Pro Val Leu Ala Glu
 405 410 415
 Lys Cys Ser Gln Glu Leu Glu Phe Ile Glu Lys Gly Leu Lys Lys Val
 420 425 430
 Glu Glu Met Gly Leu Ala Glu Lys Gly Asp Leu Val Val Leu Thr Ser
 435 440 445
 Gly Val Pro Gly Lys Val Gly Thr Thr Asn Thr Ile Arg Val Leu Lys
 450 455 460
 Val Asp
 465

<210> 24

<211> 477

<212> PRT

ES 2 398 018 T3

<213> Pyrococcus furiosus

<400> 24

Met Arg Arg Val Lys Leu Pro Ser His Lys Thr Lys Ile Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Ile Gly Pro Ala Thr Asn Ser Arg Lys Met Ile Lys Gl n Leu Ile Lys
 20 25 30
 Ala Gly Met Asn Val Ala Arg Ile Asn Phe Ser His Gly Ser Phe Gl u
 35 40 45
 Gl u His Ala Arg Val Ile Gl u Ile Ile Arg Gl u Gl u Ala Gl n Lys Leu
 50 55 60
 Asp Arg Arg Val Ala Ile Leu Ala Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ile Arg
 65 70 75 80
 Val Gly Gl u Ile Lys Gly Gly Tyr Val Gl u Leu Lys Arg Gly Gl u Lys
 85 90 95
 Val Ile Leu Thr Thr Lys Asp Val Gl u Gly Asp Gl u Thr Thr Ile Pro
 100 105 110
 Val Asp Tyr Lys Gly Phe Pro Asn Leu Val Ser Lys Gly Asp Ile Ile
 115 120 125
 Tyr Leu Asn Asp Gly Tyr Ile Val Leu Lys Val Gl u Asn Val Arg Gl u
 130 135 140
 Asn Gl u Val Gl u Ala Val Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Phe Ser Arg
 145 150 155 160
 Lys Gly Val Asn Ile Pro Lys Ala Tyr Leu Pro Val Gl u Ala Ile Thr
 165 170 175
 Pro Lys Asp Phe Gl u Ile Met Lys Phe Ala Ile Gl u His Gly Val Asp
 180 185 190
 Ala Ile Gly Leu Ser Phe Val Gly Ser Val Tyr Asp Val Leu Lys Ala
 195 200 205
 Lys Ser Phe Leu Gl u Lys Asn Asn Ala Gl u Asp Val Phe Val Ile Ala
 210 215 220
 Lys Ile Gl u Arg Pro Asp Ala Val Arg Asn Phe Asp Gl u Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Ala Ala Asp Gly Ile Met Ile Ala Arg Gly Asp Leu Gly Val Gl u Met
 245 250 255
 Pro Ile Gl u Gl n Leu Pro Ile Leu Gl n Lys Lys Leu Ile Arg Lys Ala
 260 265 270
 Asn Met Gl u Gly Lys Pro Val Ile Thr Ala Thr Gl n Met Leu Val Ser
 275 280 285
 Met Thr Thr Gl u Lys Val Pro Thr Arg Ala Gl u Val Thr Asp Val Ala
 290 295 300
 Asn Ala Ile Leu Asp Gly Thr Asp Ala Val Met Leu Ser Gl u Gl u Thr
 305 310 315 320
 Ala Ile Gly Lys Phe Pro Ile Gl u Thr Val Gl u Met Met Gly Lys Ile
 325 330 335
 Ala Lys Val Thr Gl u Gl u Tyr Arg Gl u Ser Phe Gly Leu Ser Arg Ile
 340 345 350
 Arg Gl u Phe Met Gl u Ile Lys Lys Gly Thr Ile Lys Gl u Ala Ile Thr
 355 360 365
 Arg Ser Ile Ile Asp Ala Ile Cys Thr Ile Asp Ile Lys Phe Ile Leu
 370 375 380
 Thr Pro Thr Arg Thr Gly Arg Thr Ala Arg Leu Ile Ser Arg Phe Lys
 385 390 395 400
 Pro Lys Gl n Trp Ile Leu Ala Phe Ser Thr Asn Gl u Arg Val Cys Asn
 405 410 415
 Asn Leu Met Phe Ser Tyr Gly Val Tyr Pro Phe Cys Leu Gl u Gl u Gly
 420 425 430
 Phe Asp Gl u Asn Asp Ile Val Arg Leu Ile Lys Gly Leu Gly Leu Val
 435 440 445
 Gl u Ser Asp Asp Met Val Leu Met Thr Gl u Gly Lys Pro Ile Gl u Lys
 450 455 460
 Thr Val Gly Thr Asn Ser Ile Lys Ile Phe Gl n Ile Ala
 465 470 475

<210> 25

<211> 408

<212> PRT

ES 2 398 018 T3

<213> Methanosarcina thermophila

<400> 25

Met Lys Val Leu Val Ile Asn Ala Gly Ser Ser Ser Leu Lys Tyr Gln
 1 5 10 15
 Leu Ile Asp Met Thr Asn Glu Ser Ala Leu Ala Val Gly Leu Cys Glu
 20 25 30
 Arg Ile Gly Ile Asp Asn Ser Ile Ile Thr Gln Lys Lys Phe Asp Gly
 35 40 45
 Lys Lys Leu Glu Lys Leu Thr Asp Leu Pro Thr His Lys Asp Ala Leu
 50 55 60
 Glu Glu Val Val Lys Ala Leu Thr Asp Asp Glu Phe Gly Val Ile Lys
 65 70 75
 Asp Met Gly Glu Ile Asn Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly
 80 85 90 95
 Glu Lys Phe Thr Thr Ser Ala Leu Tyr Asp Glu Gly Val Glu Lys Ala
 100 105 110
 Ile Lys Asp Cys Phe Glu Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Pro Asn Met
 115 120 125
 Met Gly Ile Ser Ala Cys Ala Glu Ile Met Pro Gly Thr Pro Met Val
 130 135 140
 Ile Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Met Pro Pro Tyr Ala Tyr
 145 150 155 160
 Met Tyr Ala Leu Pro Tyr Asp Leu Tyr Glu Lys His Gly Val Arg Lys
 165 170 175
 Tyr Gly Phe His Gly Thr Ser His Lys Tyr Val Ala Glu Arg Ala Ala
 180 185 190
 Leu Met Leu Gly Lys Pro Ala Glu Glu Thr Lys Ile Ile Thr Cys His
 195 200 205
 Leu Gly Asn Gly Ser Ser Ile Thr Ala Val Glu Gly Gly Lys Ser Val
 210 215 220
 Glu Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Ala Met Gly Thr
 225 230 235 240
 Arg Cys Gly Ser Ile Asp Pro Ala Ile Val Pro Phe Leu Met Glu Lys
 245 250 255
 Glu Gly Leu Thr Thr Arg Glu Ile Asp Thr Leu Met Asn Lys Lys Ser
 260 265 270
 Gly Val Leu Gly Val Ser Gly Leu Ser Asn Asp Phe Arg Asp Leu Asp
 275 280 285
 Glu Ala Ala Ser Lys Gly Asn Arg Lys Ala Glu Leu Ala Leu Glu Ile
 290 295 300
 Phe Ala Tyr Lys Val Lys Lys Phe Ile Gly Glu Tyr Ser Ala Val Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Ala Asp Ala Val Val Phe Thr Ala Gly Ile Gly Glu Asn Ser
 325 330 335
 Ala Ser Ile Arg Lys Arg Ile Leu Thr Gly Leu Asp Gly Ile Gly Ile
 340 345 350
 Lys Ile Asp Asp Glu Lys Asn Lys Ile Arg Gly Gln Glu Ile Asp Ile
 355 360 365
 Ser Thr Pro Asp Ala Lys Val Arg Val Phe Val Ile Pro Thr Asn Glu
 370 375 380
 Glu Leu Ala Ile Ala Arg Glu Thr Lys Glu Ile Val Glu Thr Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Leu Arg Ser Ser Ile Pro Val
 405

<210> 26

<211> 585

<212> ADN

<213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 26

atgaagattg gtattgtaac tggattcct ggtgtagggg aaagtactgt cttggctaaa 60
 gttaaagaga tattggataa tcaaggata aataacaaga tcataaatia tggagatttt 120
 atgttagcaa cagcattaaa attaggctat gctaaagata gagacgaaat gagaaaatta 180
 tctgtagaaa agcagaagaa attgcagatt gatgcgcta aaggtatagc tgaagaggca 240

ES 2 398 018 T3

agagcaggtg	gagaaggata	tctgttcata	gatacgcacg	ctgtgatacg	tacaccctct	300
ggatatttac	ctggttfacc	gtcatatgta	attacagaaa	taaatccgtc	tgttatcttt	360
ttactggaag	ctgatcctaa	gataatatta	tcaaggcaaa	agagagatac	aacaaggaat	420
agaaatgatt	atagtgcagc	atcagttata	ttagaaacca	taaacttcgc	tagataatgca	480
gctactgctt	ctgcagtatt	agccggttct	actgttaagg	taattgtaaa	cgtggaagga	540
gatcctagta	tagcagctaa	tgagataata	aggctatga	agtaa		585

<210> 27
 <211> 585
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 27						
atgaaaaatcg	gtatcgttac	cggtatcccg	gggtgttgga	aatctaccgt	tctggctaaa	60
gttaaagaaa	tcctggacaa	ccagggtatc	aacaacaaaa	tcatcaacta	cggtgacttc	120
atgctggcta	ccgcctgaa	actgggttac	gctaaagacc	gtgacgaaat	gcgtaaactg	180
tctgttgaaa	aacagaaaaa	actgcagatc	gacgctgcta	aaggatcgc	tgaagaagct	240
cgtgctgggtg	gtgaaggtta	cctgttcac	gacaccacg	ctggtatccg	taccccgctt	300
ggttaccctgc	gggtctgccc	gtcttacggt	atcaccgaaa	tcaaccgcgc	tgttatcttc	360
ctgctggaag	ctgaccgcaa	aatcatcctg	tctcgtcaga	aacgtgacac	caccgcgtaac	420
cgtaacgact	actctgacga	atctgttatc	ctggaacca	tcaacttcgc	tcgttacgct	480
gctaccgctt	ctgctgttct	ggctggttct	accgttaaag	ttatcgttaa	cgttgaaggt	540
gaccgcgtcta	tcgctgctaa	cgaaatcatc	cgttctatga	aatag		585

<210> 28
 <211> 663
 <212> ADN
 <213> Thermotoga maritima

<400> 28						
atgatggcgt	accttgtctt	tctaggacct	ccagggtcag	gaaaaggaac	ctacgcaaag	60
agattgcagg	aaataacggg	gattcctcat	atatccaccg	gtgacatctt	cagggacatt	120
gtaaaaaaag	agaacgacga	gcttgggaaa	aagataaaaag	agatcatgga	aaggggagaa	180
ctcgttccgg	acgaactcgt	gaacgaggtt	gtgaaaagaa	gactctcaga	aaaagattgt	240
gaaagaggat	tcatactgga	cggctatcca	agaaccggtg	ctcaggcggg	attcctcgac	300
ggctttttga	aaactcaaaa	caaagagctc	acggctgctg	tactctttga	agttcctgag	360
gaagtggctg	ttcagaggct	cacggccaga	aggatctgcc	cgaaatgtgg	aagaatttac	420
aatttgattt	cgctccctcc	aaaagaagac	gaactgtgcg	atgattgtaa	agtgaagctc	480
gttcagagag	aagacgacaa	agaagaaca	gtgagacaca	gatcaagggt	ttatctcgaa	540
aagacacagc	cagtatttga	ttactacgat	aaaaagggca	ttctcaaacc	agtggatggt	600
accataggaa	tagacaacgt	gatcgcgtgaa	gtgttaaaga	taatagggtg	gagtgataaa	660
tga						663

<210> 29
 <211> 660
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 29						
atgatggcct	atctggtttt	tcttgggtcca	ccgggggcag	gcaaagggtac	atatgcaaaa	60
cgttttacagg	aaatcaccgg	catcccgcac	attagcacgg	gcgacatctt	tcgtgatatt	120
gtcaaaaagg	aaaatgacga	attaggttaag	aaaatataag	aaattatgga	gcgcggcgag	180
ttggtgccgg	acgaactggg	gaatgaagtt	gtcaaacgctc	ggctgtctga	aaaggattgc	240
gaacgtggct	ttattttggg	cggttacccg	cgtacagtag	ctcaggcaga	gtttctcgac	300
ggcttccctga	agactcagaa	taaggagtta	acggctgcgg	tcctgttcga	ggtgcctgaa	360
gaggtggctc	ttcagcgtct	gaccgcgcgg	cgtatctgcc	cgaagtgtgg	tcgtatttac	420
aacctgattt	cacttctctc	aaaagaagat	gaactgtgtg	atgactgcaa	agtaaaactg	480
gtgcaacgcg	aagatgataa	agaggaaact	gtgcgccatc	gctacaaagt	atatctggaa	540
aaaacccaac	cggttatcga	ttattatgat	aaaaaaggca	ttttgaaacg	cgttgaatggg	600

ES 2 398 018 T3

accatcggca tcgataacgt gattgccgaa gttctcaaaa tcattgggtg gagtgataaa 660

<210> 30
 <211> 651
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 30
 atgaacctga ttttcctggg tccgcctggg gcaggcaaag gcacccaggc gaaacgtgtg 60
 tcTgaaaagt acggtatccc gcagattagt accggcgata tgctgcgiga agcggttgct 120
 aagggtacgg aactggggaa aaaggcgaaa gaatatatgg acaaagggga acttgttccg 180
 gatgaagtag ttattggaat cgtgaaagaa cgcctccagc aaccggatig tgagaagggc 240
 ttatttctgg acggttttcc ggttacgita gcacaagccg aagctctgga cgaaatgita 300
 aaagaattga ataagaaaat tgacgcgta atcaacgtgg tcgtaccgga agaggaagtt 360
 gtcaagcgta ttacctatcg tcgcaattgc cgcaattgcy gcgccgtgta ccatctcatt 420
 tatgcacctc caaaagagga taataaatgt gataaatgcy gcggtgagct ttatcagcgt 480
 gatgacgata aagaagagac agtccgcgag cgttaccgtg tgtataaaca gaacacagag 540
 ccattgatcg attattaccg taaaaggga atcctgtatg atgtggatgg tactaaagac 600
 atcgaaggag tttggaaaga aattgaggcy attctggaaa aaattaaaag c 651

<210> 31
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 31

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gl n Gly Ile Asn Asn
 20 25 30
 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Gl u Lys
 50 55 60
 Gl n Lys Lys Leu Gl n Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Gl u Gl u Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95
 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110
 Gl u Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Gl u Ala Asp Pro Lys Ile
 115 120 125
 Ile Leu Ser Arg Gl n Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
 130 135 140
 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
 165 170 175
 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
 180 185 190
 Met Lys

<210> 32
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Thermotoga maritima

<400> 32

ES 2 398 018 T3

Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
 20 25 30
 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu
 35 40 45
 Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
 50 55 60
 Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys
 65 70 75 80
 Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala
 85 90 95
 Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala
 100 105 110
 Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr
 115 120 125
 Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
 130 135 140
 Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
 145 150 155 160
 Val Gln Arg Glu Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
 165 170 175
 Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
 180 185 190
 Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile
 195 200 205
 Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 210 215 220

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sustrato de transglutaminasa

<400> 33

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly
 1 5 10

<210> 34
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa termoestable de Sulfolobus acidocaldarius fusionada al extremo N-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)

<400> 34

Met Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys
 20 25 30
 Glu Ile Leu Asp Asn Gln Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly
 35 40 45
 Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg
 50 55 60
 Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly

ES 2 398 018 T3

Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr
 100 105 110
 Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val
 115 120 125
 Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gl n Lys
 130 135 140
 Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile
 145 150 155 160
 Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val
 165 170 175
 Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro
 180 185 190
 Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser Met Lys
 195 200

<210> 35
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa termoestable de Sulfolobus acidcaldarius fusionada al extremo C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)

<400> 35

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gl n Gly Ile Asn Asn
 20 25 30
 Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
 50 55 60
 Gl n Lys Lys Leu Gl n Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
 65 70 75 80
 Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
 85 90 95
 Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
 100 105 110
 Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile
 115 120 125
 Ile Leu Ser Arg Gl n Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
 130 135 140
 Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
 165 170 175
 Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
 180 185 190
 Met Lys Gly Gly Asn Gl n Glu Gl n Val Ser Pro Leu
 195 200

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa termoestable de Sulfolobus acidcaldarius fusionada al extremo N-terminal y C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII)

<400> 36

ES 2 398 018 T3

Met Asn Gl n Gl u Gl n Val Ser Pro Leu Gly Gly Lys Ile Gly Ile Val
 1 5 10 15
 Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys
 20 25 30
 Gl u Ile Leu Asp Asn Gl n Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly
 35 40 45
 Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg
 50 55 60
 Asp Gl u Met Arg Lys Leu Ser Val Gl u Lys Gl n Lys Lys Leu Gl n Ile
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Gl u Gl u Ala Arg Ala Gly Gly Gl u Gly
 85 90 95
 Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr
 100 105 110
 Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr Gl u Ile Asn Pro Ser Val
 115 120 125
 Ile Phe Leu Leu Gl u Ala Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gl n Lys
 130 135 140
 Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Gl u Ser Val Ile
 145 150 155 160
 Leu Gl u Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val
 165 170 175
 Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val Asn Val Gl u Gly Asp Pro
 180 185 190
 Ser Ile Ala Ala Asn Gl u Ile Ile Arg Ser Met Lys Gly Gly Asn Gl n
 195 200 205
 Gl u Gl n Val Ser Pro Leu
 210

<210> 37
 <211> 704
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 5' de adenilato quinasa de Thermotoga maritima.

<400> 37
 atgaatcaag aacaagtcag cccgctgggc ggcattcatcg cctatctggt ttttcttggg 60
 ccaccggggg caggcaaagg tacctatgcg aaacgtttac aggaaatcac cggcatcccg 120
 cacattagca cgggcgacat ttttcgtgat attgtcaaaa aggaaaatga cgaattagggt 180
 aagaaaatta aagaattat ggagcgcggc gagttggtgc cggacgaact ggtgaatgaa 240
 gttgtcaaac gtcggctgtc tgaaaaggat tgcgaacgtg gctttatit ggacggttac 300
 ccgctacag tagctcaggc agagtcttc gacggcticc tgaagactca gaataaggag 360
 ttaacggctg cggctctggt cgaggtgcct gaagaggtgg tcgttcagcg tctgaccgcg 420
 cggcgtatct gccgaagtg tggctgatt tacaacctga tttcacticc tccaaaagaa 480
 gatgaactgt gtgatgactg caaagtaaaa ctggtgcaac gcgaagatga taaagaggaa 540
 actgtgcgcc atcgtacaa agtatatctg gaaaaaacc aaccggttat cgattattat 600
 gataaaaaag gcaitttgaa acgcgttgat gggaccatcg gcatcgataa cgtgattgcc 660
 gaagtctca aatcatiggt gtggagtgat aataggtcg acgc 704

<210> 38
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de Thermotoga maritima fusionada al extremo N-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).

<400> 38

Met Asn Gl n Gl u Gl n Val Ser Pro Leu Gly Gly Ile Ile Ala Tyr Leu

ES 2 398 018 T3

1 5 10 15
 Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe
 35 40 45
 Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys
 50 55 60
 Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu
 65 70 75 80
 Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile
 85 90 95
 Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly
 100 105 110
 Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu
 115 120 125
 Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys
 130 135 140
 Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp
 165 170 175
 Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys
 180 185 190
 Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg
 195 200 205
 Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys
 210 215 220
 Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 225 230

<210> 39
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada al extremo 3' de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.

<400> 39
 atgatggcct atctggtttt tcttgggtcca cggggggcag gcaaaggtag ctatgcgaaa 60
 cgtttacagg aatcaccgg catcccgcac attagcacgg gcgacatitt tcgtgatatt 120
 gtcaaaaagg aaaatgacga attaggaag aaaaitaaag aaattatgga gcgcggcgag 180
 ttggtgccgg acgaactggt gaatgaagt gtcaaacgtc ggctgtctga aaaggattgc 240
 gaacgtggct ttattttgga cggttaccgg cgtacagtag ctacaggcaga gtttctcgac 300
 ggcttctga agactcagaa taaggagtta acggctgcgg tcctgttcga ggtgcctgaa 360
 gaggtggctg ttcagcgtct gaccgcgcgg cgtatctgcc cgaagtgtgg tcgtatttac 420
 aacctgattt cacttctcc aaaagaagat gaactgtgtg atgactgcaa agtaaaactg 480
 gtgcaacgcg aagatgataa agaggaaact gtgcgccatc gctacaaagt atatctggaa 540
 aaaaccaaac cggttatcga ttattatgat aaaaaaggca ttttgaaacg cgttgatggg 600
 accatcggca tcgataacgt gattgccgaa gttctcaaaa tcatgggtg gagtgataaa 660
 ctgggcggca atcaagaaca agtcagcccc ctgtaa 696

<210> 40
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).

<400> 40

Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
 1 5 10 15

ES 2 398 018 T3

Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gl n Gl u Ile Thr Gly Ile Pro Hi s Ile Ser
 20 25 30
 Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Gl u Asn Asp Gl u Leu
 35 40 45
 Gly Lys Lys Ile Lys Gl u Ile Met Gl u Arg Gly Gl u Leu Val Pro Asp
 50 55 60
 Gl u Leu Val Asn Gl u Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Gl u Lys Asp Cys
 65 70 75 80
 Gl u Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gl n Ala
 85 90 95
 Gl u Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gl n Asn Lys Gl u Leu Thr Ala
 100 105 110
 Ala Val Leu Phe Gl u Val Pro Gl u Gl u Val Val Val Gl n Arg Leu Thr
 115 120 125
 Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
 130 135 140
 Leu Pro Pro Lys Gl u Asp Gl u Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
 145 150 155 160
 Val Gl n Arg Gl u Asp Asp Lys Gl u Gl u Thr Val Arg Hi s Arg Tyr Lys
 165 170 175
 Val Tyr Leu Gl u Lys Thr Gl n Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
 180 185 190
 Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile
 195 200 205
 Ala Gl u Val Leu Lys Ile Ile Gl y Trp Ser Asp Lys Leu Gl y Gl y Asn
 210 215 220
 Gl n Gl u Gl n Val Ser Pro Leu
 225 230

<210> 41
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII) fusionada a los extremos 5' y 3' de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*.

<400> 41
 atgaatcaag aacaagtcag cccgctgggc ggcacatcgc cctatctggt ttttcttggg 60
 ccaccggggg caggcaaagg tacctatgcg aaacgtttac aggaaatcac cggcatcccg 120
 cacattagca cggcgacat ttttcgtgat attgtcaaaa aggaaatga cgaattaggt 180
 aagaaaatta aagaaattat ggagcgcggc gagttggtgc cggacgaact ggtgaatgaa 240
 gttgtcaaac gtcgctgtc tgaaaaggat tgcgaacgtg gctttatit ggacggttac 300
 ccgctacag tagctcaggc agagtcttc gacggcticc tgaagactca gaataaggag 360
 ttaacggctg cggctctgtt cgaggtgcct gaagaggagg tcgttcagcg tctgaccgag 420
 cggcgtatct gccgaagtg tggctgtatt tacaacctga tttcacticc tccaaaagaa 480
 gatgaactgt gtgatgactg caaagtaaaa ctggtgcaac gcgaagatga taaagaggaa 540
 actgtgcgcc atcgtacaa agtatatctg gaaaaaaccc aaccggttat cgattatit 600
 gataaaaaag gcattttgaa acgcgttgat gggaccatcg gcatcgataa cgtgattgcc 660
 gaagtctca aaatcatigg gtggagtgat aaactgggag gcaatcaaga acaagtcagc 720
 ccgctgtaa 729

<210> 42
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de proteína de adenilato quinasa de *Thermotoga maritima* fusionada al extremo N-terminal y C-terminal con una secuencia de sustrato de transglutaminasa (Factor XIII).

<400> 42

Met Asn Gl n Gl u Gl n Val Ser Pro Leu Gly Gly Ile Ile Ala Tyr Leu
 1 5 10 15

ES 2 398 018 T3

Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg
 20 25 30
 Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe
 35 40 45
 Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys
 50 55 60
 Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu
 65 70 75
 Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile
 85 90 95
 Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly
 100 105 110
 Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu
 115 120 125
 Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys
 130 135 140
 Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu
 145 150 155 160
 Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp
 165 170 175
 Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys
 180 185 190
 Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg
 195 200 205
 Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile Ala Glu Val Leu Lys
 210 215 220
 Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys Leu Gly Gly Asn Gln Glu Gln Val Ser
 225 230 235 240
 Pro Leu

<210> 43
 <211> 1288
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de constructo génico de Sup35 completo de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 43
 gattcaaacc aaggcaacaa tcagcaaaac taccagcaat acagccagaa cggtaaccaa 60
 caacaaggta acaacagata ccaaggttat caagcttaca atgctcaagc ccaacctggg 120
 ggtgggtact accaaaatta ccaaggttat tctgggtacc aacaaggagg ctatcaacag 180
 tacaatcccg acgccggtta ccagcaacag tataatcctc aaggaggctt tcaacagtac 240
 aatcctcaag gcggttatca gcaccaattc aatccacaag gtggccgtgg aaattacaaa 300
 aacttcaact acaataacaa tttgcaagga tatcaagctg gttccaacc acagtctcaa 360
 ggtatgtctt tgaacgactt tcaaaagcaa caaaagcagg ccgctcccaa accaaagaag 420
 actttgaagc ttgtctccag ttctgtatc aagttggcca atgctaccaa gaaggtgac 480
 acaaaacctg ccgaatctga taagaagagag gaagagaagt ctgctgaaac caaagaacca 540
 actaaagagc caacaagggt cgaagaacca gttaaaagg aggagaacc agtccagact 600
 gaagaaaaga cggaggaaaa atcggaaactt ccaaaggtag aagacctta aatctctgaa 660
 tcaacacata ataccaacaa tgccaatggt accagtgtct atgccttgat caaggaacag 720
 gaagaagaag tggatgacga agttgttaac gatatgtttg gtggtaaaga tcacgtttct 780
 ttaattitca tgggtcatgt tgatgccggt aaatctacta tgggtggtaa tctactatac 840
 ttgactggct ctgtggataa gagaactatt gagaaatag aaagagaagc caaggatgca 900
 gccagacaag gttgtactt gtcattgggtc atggatacca acaaaagaaga aagaaatgat 960
 ggtaagacta tcgaagtgg taaggcctac tttgaaactg aaaaaggcg ttataccata 1020
 ttggtgctc ctggtcataa aatgtacggt tccgagatga tcggtggtgc ttctcaagct 1080
 gatgttggtg ttttggtcat ttccgccaga aagggtagt acgaaaccgg ttttgagaga 1140
 ggtgtcaaaa ctcgtgaaca cgccctattg gccaaagacc aagggtgtaa taagatggtt 1200
 gtcgtcgtaa ataagatgga tgaccaaac gttaactggt ctaaggaacg ttacgaccaa 1260
 tgtgtgagta atgtcagcaa tttcttga 1288

<210> 44
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 398 018 T3

<220>

<223> Secuencia proteica de Sup35 completa de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 44

Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln
 1 5 10 15
 Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala
 20 25 30
 Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln
 35 40 45
 Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Asp
 50 55 60
 Ala Gly Tyr Gln Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Tyr Gln Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly Arg
 85 90 95
 Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr Gln
 100 105 110
 Ala Gly Phe Gln Pro Gln Ser Gln Gly Met Ser Leu Asn Asp Phe Gln
 115 120 125
 Lys Gln Gln Lys Gln Ala Ala Pro Lys Pro Lys Lys Thr Leu Lys Leu
 130 135 140
 Val Ser Ser Ser Cys Ile Lys Leu Ala Asn Ala Thr Lys Lys Val Asp
 145 150 155 160
 Thr Lys Pro Ala Glu Ser Asp Lys Lys Glu Glu Glu Lys Ser Ala Glu
 165 170 175
 Thr Lys Glu Pro Thr Lys Glu Pro Thr Lys Val Glu Glu Pro Val Lys
 180 185 190
 Lys Glu Glu Lys Pro Val Gln Thr Glu Glu Lys Thr Glu Glu Lys Ser
 195 200 205
 Glu Leu Pro Lys Val Glu Asp Leu Lys Ile Ser Glu Ser Thr His Asn
 210 215 220
 Thr Asn Asn Ala Asn Val Thr Ser Ala Asp Ala Leu Ile Lys Glu Gln
 225 230 235 240
 Glu Glu Glu Val Asp Asp Glu Val Val Asn Asp Met Phe Gly Gly Lys
 245 250 255
 Asp His Val Ser Leu Ile Phe Met Gly His Val Asp Ala Gly Lys Ser
 260 265 270
 Thr Met Gly Gly Asn Leu Leu Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Lys Arg
 275 280 285
 Thr Ile Glu Lys Tyr Glu Arg Glu Ala Lys Asp Ala Gly Arg Gln Gly
 290 295 300
 Trp Tyr Leu Ser Trp Val Met Asp Thr Asn Lys Glu Glu Arg Asn Asp
 305 310 315 320
 Gly Lys Thr Ile Glu Val Gly Lys Ala Tyr Phe Glu Thr Glu Lys Arg
 325 330 335
 Arg Tyr Thr Ile Leu Asp Ala Pro Gly His Lys Met Tyr Val Ser Glu
 340 345 350
 Met Ile Gly Gly Ala Ser Gln Ala Asp Val Gly Val Leu Val Ile Ser
 355 360 365
 Ala Arg Lys Gly Glu Tyr Glu Thr Gly Phe Glu Arg Gly Gly Gln Thr
 370 375 380
 Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Lys Thr Gln Gly Val Asn Lys Met Val
 385 390 395 400
 Val Val Val Asn Lys Met Asp Asp Pro Thr Val Asn Trp Ser Lys Glu
 405 410 415
 Arg Tyr Asp Gln Cys Val Ser Asn Val Ser Asn Phe Leu
 420 425

<210> 45

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 398 018 T3

<223> Secuencia de ADN de codón de sup35N (dominio N-terminal) dirigido a expresión óptima en E. coli

<400> 45

```

atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac      60
cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggg taccaggcgtt acaacgctca ggctcagccg      120
ggtggtgggtt actaccagaa ctaccagggg tactccggat atcaacaggg tggttaccaa      180
caatataatc cagacgctgg ttaccagcag cagtacaacc cgcaggggtg ttaccagcag      240
tacaacccgc aaggcggata tcaacaccag ttcaatccgc agggtggtcg tggttaactac      300
aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggttaa                        348
  
```

<210> 46

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de sup35N (dominio N-terminal)

<400> 46

```

Met Asp Ser Asn  Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser
1      5      10      15
Gln Asn Gly Asn  Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln
      20      25      30
Ala Tyr Asn Ala  Gln Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr
      35      40      45
Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro
      50      55      60
Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln
      65      70      75      80
Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly
      85      90      95
Arg Gly Asn Tyr  Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
      100     105     110
Gln Ala Gly
      115
  
```

<210> 47

<211> 941

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius dirigida a codones en E. Coli fusionada al extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 47

```

atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac      60
cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggg taccaggcgtt acaacgctca ggctcagccg      120
ggtggtgggtt actaccagaa ctaccagggg tactccgggtt atcagcaagg tggttaccaa      180
caatataatc cagacgctgg ctatcaacag caatataatc ctcaggggtg ttaccagcag      240
tacaacccgc aaggcgggta tcaacaccag ttcaatccgc agggtggtcg tggttaactac      300
aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat gaagatcggc      360
attgtgaccg gattccggg cgttggcaaa agcaccgttc tggcaagggt gaaggagatc      420
ctggacaacc agggcattaa taacaaaatt attaatatg gtgattttat gctggcgacc      480
gcgctgaagc tgggctacgc aaaagatcgt gacgaaatgc gcaaactgag cgtggaaaaa      540
cagaagaagc tgcagattga tgcggcgaag ggcattgcgg aagaggcacg cgcggggcgg      600
gaaggctacc tgtttatcga taccaatgcg gtgatccgca ccccgagcgg ttatctgccg      660
ggcctgccgt cttacgtgat tacggaaatc aacccgagcg ttatitttct gctggaggca      720
gatccgaaga ttattctgag cgcgagaag cgcgatacca cccgcaaccg caacgattat      780
agcgcagaaa gcgttatcct ggagaccatc aactttgcgc gctatgcggc aaccgcgagc      840
cggttctcgg caggctctac cgttaaagtg atcgtgaacg tggaggtgta tccaagcatc      900
  
```

ES 2 398 018 T3

gcggcgaacg aatcattcg cagcatgaaa taagtcgacg c

941

<210> 48
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de Adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius fusionada al extremo N-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 48

Met Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser
 1 5 10 15
 Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln
 20 25 30
 Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Asp Ala Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Pro Gln Gly Gly Tyr Gln His Gln Phe Asn Pro Gln Gly Gly
 85 90 95
 Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Leu Gln Gly Tyr
 100 105 110
 Gln Ala Gly Ile Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val
 115 120 125
 Gly Lys Ser Thr Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gln
 130 135 140
 Gly Ile Asn Asn Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Leu Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu
 165 170 175
 Ser Val Glu Lys Gln Lys Lys Leu Gln Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile
 180 185 190
 Ala Glu Glu Ala Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr
 195 200 205
 His Ala Val Ile Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser
 210 215 220
 Tyr Val Ile Thr Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Asp Pro Lys Ile Ile Leu Ser Arg Gln Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn
 245 250 255
 Arg Asn Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe
 260 265 270
 Ala Arg Tyr Ala Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val
 275 280 285
 Lys Val Ile Val Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu
 290 295 300
 Ile Ile Arg Ser Met Lys
 305 310

<210> 49
 <211> 947
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN de adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius dirigida a codones en E. Coli fusionada al extremo C-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 49

ES 2 398 018 T3

```

atgaagatcg gcattgtgac cggcattccg ggcgttggca aaagcaccgt tctggcaaag      60
gtgaaggaga tcctggacaa ccagggcatt aataacaaaa ttattaatta tggtgatttt      120
atgctggcga ccgcgctgaa gctgggctac gcaaaagatc gtgacgaaat gcgcaactg      180
agcgtggaaa aacagaagaa gctgcagatt gatgcggcga agggcattgc ggaagaggca      240
cgcgcgggcg gcgaaggcta cctgtttatc gatacccatg cggtgatccg caccgccgagc      300
ggttatctgc cgggcctgcc gtcctacgtg attacggaaa tcaaccggag cgttatTTTT      360
ctgctggagg cagatccgaa gattatctg agccgccaga agcgcgatac caccgcgaac      420
cgcaacgatt atagcgacga aagcgttata ctggagacca tcaactttgc gcgctatgcg      480
gcaaccgca gcgcggttct ggcaggctct accgttaaag tgatcgtgaa cgtggagggt      540
gatccaagca tcgcggcgaa cgaatcatt cgcagcatga aacagtcgag tatggactct      600
aaccagggtta acaaccagca gaactaccag cagtactctc agaacggtaa ccagcagcag      660
ggtacaacc gttaccaggg ttaccaggct tacaacgctc aggcctagcc ggggtggtgg      720
tactaccaga actaccaggg ttactccggg taticagcaag gtggctacca acaataaat      780
ccagacgctg gctatcaaca gcaatataat cctcagggtg gttaccagca gtacaaccgg      840
caaggcgggt atcaacacca gttcaatccg cagggtggtc gtggtacta caaaaacttc      900
aactacaaca acaacctgca gggttaccag gctggttaag tcgacgc      947

```

<210> 50
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de Adenilato quinasa de Sulfolobus acidcaldarius fusionada al extremo C-terminal con el dominio N-terminal de Sup35 de Saccharomyces cerevisiae

<400> 50

```

Met Lys Ile Gly Ile Val Thr Gly Ile Pro Gly Val Gly Lys Ser Thr
 1      5      10      15
Val Leu Ala Lys Val Lys Glu Ile Leu Asp Asn Gl n Gly Ile Asn Asn
      20      25      30
Lys Ile Ile Asn Tyr Gly Asp Phe Met Leu Ala Thr Ala Leu Lys Leu
      35      40      45
Gly Tyr Ala Lys Asp Arg Asp Glu Met Arg Lys Leu Ser Val Glu Lys
      50      55      60
Gl n Lys Lys Leu Gl n Ile Asp Ala Ala Lys Gly Ile Ala Glu Glu Ala
      65      70      75      80
Arg Ala Gly Gly Glu Gly Tyr Leu Phe Ile Asp Thr His Ala Val Ile
      85      90      95
Arg Thr Pro Ser Gly Tyr Leu Pro Gly Leu Pro Ser Tyr Val Ile Thr
      100      105      110
Glu Ile Asn Pro Ser Val Ile Phe Leu Leu Glu Ala Asp Pro Lys Ile
      115      120      125
Ile Leu Ser Arg Gl n Lys Arg Asp Thr Thr Arg Asn Arg Asn Asp Tyr
      130      135      140
Ser Asp Glu Ser Val Ile Leu Glu Thr Ile Asn Phe Ala Arg Tyr Ala
      145      150      155      160
Ala Thr Ala Ser Ala Val Leu Ala Gly Ser Thr Val Lys Val Ile Val
      165      170      175
Asn Val Glu Gly Asp Pro Ser Ile Ala Ala Asn Glu Ile Ile Arg Ser
      180      185      190
Met Lys Gl n Ser Ser Met Asp Ser Asn Gl n Gly Asn Asn Gl n Gl n Asn
      195      200      205
Tyr Gl n Gl n Tyr Ser Gl n Asn Gly Asn Gl n Gl n Gl n Gly Asn Asn Arg
      210      215      220
Tyr Gl n Gly Tyr Gl n Ala Tyr Asn Ala Gl n Ala Gl n Pro Gly Gly Gly
      225      230      235      240
Tyr Tyr Gl n Asn Tyr Gl n Gly Tyr Ser Gly Tyr Gl n Gl n Gly Gly Tyr
      245      250      255
Gl n Gl n Tyr Asn Pro Asp Ala Gly Tyr Gl n Gl n Gl n Tyr Asn Pro Gl n
      260      265      270
Gly Gly Tyr Gl n Gl n Tyr Asn Pro Gl n Gly Gly Tyr Gl n His Gl n Phe
      275      280      285
Asn Pro Gl n Gly Gly Arg Gly Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn
      290      295      300

```

ES 2 398 018 T3

Asn Leu Gl n Gl y Tyr Gl n Al a Gl y
305 310

<210> 51
<211> 1011
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 5' de adenilato quinasa de Thermotoga maritima.

<400> 51
atggactcta accagggtaa caaccagcag aactaccagc agtactctca gaacggtaac 60
cagcagcagg gtaacaaccg ttaccagggg taccaggcct acaacgctca ggctcagccg 120
gggtgtgggt actaccagaa ctaccagggg tactccgggt atcagcaagg iggctaccaa 180
caataataat cagacgctgg ctatcaacag caataataat ctcaggggtg ttaccagcag 240
tacaaccgcg aaggcggtta tcaaccagc ttcaatccgc aggggtgctg tggttaactac 300
aaaaacttca actacaacaa caacctgcag ggttaccagg ctggaattat gatggcctat 360
ctggtttttc ttggtccacc gggggcaggc aaaggtaact atgcgaaacg ittacaggaa 420
atcaccggca tcccgcacat tagcacgggc gacatttttc gtgatattgt caaaaaggaa 480
aatgacgaat taggtaagaa aattaaagaa attatggagc gcggcgagtt ggtgccggac 540
gaactgggtga atgaagtgt caaacgtcgg ctgtctgaaa aggattgcga acgtggcitt 600
atthtggacg gttaccgcg tacagtagct caggcagagt ttctcgacgg ctctcgaag 660
actcagaata aggagttaac ggctgcggtc ctgttcgagg tgcctgaaga ggtggctcgt 720
cagcgtctga ccgcgcgcg tatctgcccg aagtgtggic gtatttacia cctgattica 780
cttctcccaa aagaagatga actgtgtgat gactgcaaag taaaactggg gcaacgcgaa 840
gatgataaag aggaactgt gcgccatcgc tacaagtat atctggaaaa aaccaaccg 900
gttatcgatt attatgataa aaaaggcatt ttgaaacgcg ttgatgggac catcggcatc 960
gataacgtga ttgccgaagt tctcaaaatc attgggtgga gtgataaata g 1011

<210> 52
<211> 336
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia proteica de adenilato quinasa de Thermotoga maritima fusionada en el extremo N-terminal con Sup35N.

<400> 52
Met Asp Ser Asn Gl n Gl y Asn Asn Gl n Gl n Asn Tyr Gl n Gl n Tyr Ser
1 5 10 15
Gl n Asn Gl y Asn Gl n Gl n Gl n Gl y Asn Asn Arg Tyr Gl n Gl y Tyr Gl n
20 25 30
Al a Tyr Asn Al a Gl n Al a Gl n Pro Gl y Gl y Tyr Tyr Gl n Asn Tyr
35 40 45
Gl n Gl y Tyr Ser Gl y Tyr Gl n Gl n Gl y Gl y Tyr Gl n Gl n Tyr Asn Pro
50 55 60
Asp Al a Gl y Tyr Gl n Gl n Gl n Tyr Asn Pro Gl n Gl y Tyr Gl n Gl n
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Gl n Gl y Gl y Tyr Gl n Hi s Gl n Phe Asn Pro Gl n Gl y Gl y
85 90 95
Arg Gl y Asn Tyr Lys Asn Phe Asn Tyr Asn Asn Leu Gl n Gl y Tyr
100 105 110
Gl n Al a Gl y Ile Met Met Al a Tyr Leu Val Phe Leu Gl y Pro Pro Gl y
115 120 125
Al a Gl y Lys Gl y Thr Tyr Al a Lys Arg Leu Gl n Gl u Ile Thr Gl y Ile
130 135 140
Pro Hi s Ile Ser Thr Gl y Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Gl u
145 150 155 160
Asn Asp Gl u Leu Gl y Lys Lys Ile Lys Gl u Ile Met Gl u Arg Gl y Gl u
165 170 175
Leu Val Pro Asp Gl u Leu Val Asn Gl u Val Val Lys Arg Arg Leu Ser
180 185 190

ES 2 398 018 T3

Gl u Lys Asp Cys Gl u Arg Gl y Phe Ile Leu Asp Gl y Tyr Pro Arg Thr
 195 200 205
 Val Ala Gl n Ala Gl u Phe Leu Asp Gl y Phe Leu Lys Thr Gl n Asn Lys
 210 220
 Gl u Leu Thr Ala Ala Val Leu Phe Gl u Val Pro Gl u Gl u Val Val Val
 225 230 235 240
 Gl n Arg Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gl y Arg Ile Tyr
 245 250 255
 Asn Leu Ile Ser Leu Pro Pro Lys Gl u Asp Gl u Leu Cys Asp Asp Cys
 260 265 270
 Lys Val Lys Leu Val Gl n Arg Gl u Asp Asp Lys Gl u Gl u Thr Val Arg
 275 280 285
 Hi s Arg Tyr Lys Val Tyr Leu Gl u Lys Thr Gl n Pro Val Ile Asp Tyr
 290 295 300
 Tyr Asp Lys Lys Gl y Ile Leu Lys Arg Val Asp Gl y Thr Ile Gl y Ile
 305 310 315 320
 Asp Asn Val Ile Ala Gl u Val Leu Lys Ile Ile Gl y Trp Ser Asp Lys
 325 330 335

<210> 53

<211> 1025

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN de Sup35N fusionada en el extremo 3' de adenilato quinasa de Thermotoga maritima.

<400> 53

Ala Thr Gl y Ala Thr Gl y Gl y Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gl y Gl y
 1 5 10 15
 Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Gl y Gl y Thr Cys Cys Ala Cys Cys
 20 25 30
 Gl y Gl y Gl y Gl y Gl y Cys Ala Gl y Gl y Cys Ala Ala Ala Gl y Gl y Thr
 35 40 45
 Ala Cys Cys Thr Ala Thr Gl y Cys Gl y Ala Ala Ala Cys Gl y Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ala Cys Ala Gl y Gl y Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gl y Gl y
 65 70 75 80
 Cys Ala Thr Cys Cys Cys Gl y Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ala Gl y Cys
 85 90 95
 Ala Cys Gl y Gl y Cys Gl y Ala Cys Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys
 100 105 110
 Gl y Thr Gl y Ala Thr Ala Thr Thr Gl y Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala
 115 120 125
 Gl y Gl y Ala Ala Ala Thr Gl y Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ala Gl y
 130 135 140 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gl y Gl y Ala Gl y Cys Gl y Cys Gl y Gl y
 165 170 175
 Cys Gl y Ala Gl y Thr Thr Gl y Gl y Thr Gl y Cys Cys Gl y Gl y Ala Cys
 180 185 190 195
 Gl y Ala Ala Cys Thr Gl y Gl y Thr Gl y Ala Ala Thr Gl y Ala Ala Gl y
 200 205 210 215
 Thr Thr Gl y Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gl y Thr Cys Gl y Gl y Cys Thr
 220 225 230 235 240
 Gl y Thr Cys Thr Gl y Ala Ala Ala Gl y Gl y Ala Thr Thr Gl y Cys
 245 250 255
 Thr Gl y Gl y Ala Cys Gl y Gl y Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gl y Cys Gl y
 260 265 270
 Thr Ala Cys Ala Gl y Thr Ala Gl y Cys Thr Cys Ala Gl y Gl y Cys Ala
 275 280 285
 Gl y Ala Gl y Thr Thr Thr Cys Thr Cys Gl y Ala Cys Gl y Gl y Cys Thr
 290 295 300
 Thr Cys Cys Thr Gl y Ala Ala Gl y Ala Cys Thr Cys Ala Gl y Ala Ala
 305 310 315 320

ES 2 398 018 T3

Thr Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Ala Ala Cys Gly Gly Cys Thr
 Gly Cys Gly Gly 325 Thr Cys Cys Thr Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Gly
 Thr Gly Cys Cys 340 Thr Gly Ala Ala 345 Gly Ala Gly Thr Gly Thr
 Cys Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys
 Gly 370 Cys Gly Cys Gly Gly 375 Cys Gly Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys
 385 Cys Gly Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr Ala Thr
 Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ala
 Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly
 Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala
 450 Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Thr Gly
 Cys 465 Thr Gly Cys Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly
 Gly Thr Gly Cys Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly
 Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr
 Gly Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala
 Gly Thr Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala
 530 Cys Cys Ala Ala Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys Gly Ala
 545 Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala
 Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly
 Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly
 Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr 600 Ala Cys Gly Thr Thr Cys Thr Thr
 610 Gly Cys Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala
 625 Thr Cys Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ala
 Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Ala Gly Thr Ala Thr Gly
 Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala
 690 Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Gly
 705 Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly
 Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Gly Thr Thr Ala
 Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr
 755 Thr Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly Thr Thr Ala Cys Ala Gly Gly Cys Thr
 770 Ala Gly Cys Cys Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Ala
 785 Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly
 Gly Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Thr Cys
 820 Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Thr Ala Cys Ala
 835 Ala Cys Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys
 850 Gly Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys

ES 2 398 018 T3

865 870 875 880
Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly
885 890 895
Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys
900 905 910
Ala Ala Cys Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr
915 920 925
Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala
930 935 940
Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Thr Cys Gly Thr
945 950 955 960
Gly Gly Thr Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys Thr
965 970 975
Thr Cys Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala
980 985 990
Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly
995 1000 1005
Gly Cys Thr Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Thr Cys Gly Ala Cys
1010 1015 1020
Gly Cys
1025

<210> 54
<211> 338
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia proteica de adenilato quinasa de Thermotoga maritima fusionada en el extremo C-terminal con Sup35N

<400> 54

Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly Lys Gly
1 5 10 15
Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His Ile Ser
20 25 30
Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp Glu Leu
35 40 45
Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val Pro Asp
50 55 60
Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys Asp Cys
65 70 75 80
Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala Gln Ala
85 90 95
Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu Thr Ala
100 105 110
Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg Leu Thr
115 120 125
Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu Ile Ser
130 135 140
Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val Lys Leu
145 150 155 160
Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg Tyr Lys
165 170 175
Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp Lys Lys
180 185 190
Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Ile
195 200 205
Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys Leu Ser Ser Met
210 215 220
Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr Ser Gln
225 230 235 240
Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr Gln Ala
245 250 255
Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn Tyr Gln
260 265 270

Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr Asn Pro Asp
 Ala Gly Tyr 275 Gln Gln Gln Tyr 280 Asn Pro Gln Gly Gly Tyr 285 Gln Gln Tyr
 Asn Pro Gln Gly Gly Tyr 295 Gln His Gln Phe Asn 300 Gln Gly Gly Arg
 305 Gly Asn Tyr Lys Asn 310 Phe Asn Tyr Asn 315 Asn Leu Gln Gly Tyr Gln
 Ala Gly 325 330 335

<210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica un péptido corto de Sup35 capaz de agregarse para formar fibrilas amiloides; para utilizar como péptido de fusión con genes de tAK.

<400> 55
 ggtaacaacc agcagaacta c 21

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido amiloide derivado de Sup35

<400> 56

Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr
 1 5

<210> 57
 <211> 1593
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)

<400> 57
 atgatgatgg cgtctaagga cgctacatca agcgtggatg gcgctagtgg cgctggtcag 60
 ttggtaccgg aggttaatgc ttctgacct cttgcaatgg atcctgtagc aggttcttcg 120
 acagcagtcg cgactgctgg acaagttaat cctattgatc cctggataat taataatttt 180
 gtgcaagccc cccaagtgga atttactatt tcccaata ataccgccg tgatgtttg 240
 ttgatitga gtttgggtcc ccatctaat ctttcttgc tccatctatc acaaatgta 300
 aatggttggg ttgtaacat gagagtcagg attatgctag ctggtaatgc ctttactgcg 360
 gggagataa tagtttctg catacccct ggttttgggt cacataatct tactatagca 420
 caagcaactc tcittccaca tgtgattgct gatgttagga ctctagacc cattgagggtg 480
 cctttggaag atgttaggaa ttttctcttt cataataatg atagaaatca acaaaccatg 540
 gcctttgtgt gcatgctgta caccctctc cgcactgggt gtggtactgg tgattcttt 600
 gtagttgcag ggcgagttat gacttgcccc agtctgatt ttaatttctt gtttttagtc 660
 cctctacgg tggagcagaa aaccaggccc ttcacactcc caaatctgcc attgagtct 720
 ctgtctaact cacgtgcccc tctccaatc agtagtatgg gcatttcccc agacaatgtc 780
 cagatgtgc agttccaataa tggtcggtgt actctggatg gccgcctggt tggcaccacc 840
 ccagtttcat tgtcacatgt tgccaagata agagggacct ccaatggcac tgtaatcaac 900
 ctactgaat tggatggcac acccttcac cttttgagg gccctgcccc cattgggttt 960
 ccagacctcg gtggttgta ttggcatatc aatatgacac agtttggcca ttctagccag 1020
 acccagtatg atgtagacac caccctgac actttgtcc cccatcttgg ttcaattcag 1080
 gcaaatggca ttggcagtg taattatggt ggtgttctta gctggatttc cccccatca 1140

ES 2 398 018 T3

```

caccgctctg gctccaagt tgaccttgg aagatccca attatgggtc aagtattacg 1200
gaggcaacac atctagcccc ttctgtata cccctgggt tcggagaggt attggtcttt 1260
ttcatgtcaa aaatgccagg tcctggtgct tataattgc cctgtctatt accacaagag 1320
tacatttcac atcttgctag tgaacaagcc cctactgtag gtgaggctgc cctgctccac 1380
tatgttgacc ctgataccgg tcggaatctt ggggaattca aagcataccc tgatggttc 1440
ctcacttggt tcccaatgg ggctagctcg ggtccacaac agctgccgat caatggggtc 1500
tttgtctttg tttcatgggt gtccagattt tatcaattaa agcctgtggg aactgccagc 1560
tcggcaagag gtaggcttgg tctgcgccga taa 1593

```

<210> 58

<211> 530

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de proteína de la cápside de Norovirus (58kDa)

<400> 58

```

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser
1 5 10 15
Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala
20 25 30
Met Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln
35 40 45
Val Asn Pro Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro
50 55 60
Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Val Leu
65 70 75 80
Phe Asp Leu Ser Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Leu His Leu
85 90 95
Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Met
100 105 110
Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Val Ser Cys Ile
115 120 125
Pro Pro Gly Phe Gly Ser His Asn Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu
130 135 140
Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Ile Glu Val
145 150 155 160
Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Arg Asn
165 170 175
Gln Gln Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr
180 185 190
Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Met Thr
195 200 205
Cys Pro Ser Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr Val
210 215 220
Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser
225 230 235 240
Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser
245 250 255
Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu
260 265 270
Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala
275 280 285
Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu
290 295 300
Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe
305 310 315 320
Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly
325 330 335
His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe
340 345 350
Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn
355 360 365
Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly

```

ES 2 398 018 T3

370 375 380
 Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
 385 390 395 400
 Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu
 405 410 415
 Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn
 420 425 430
 Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu
 435 440 445
 Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro
 450 455 460
 Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
 465 470 475 480
 Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro
 485 490 495
 Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln
 500 505 510
 Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu
 515 520 525
 Arg Arg
 530

<210> 59
 <211> 1593
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en E.coli

<400> 59
 atgatgatgg cttctaaaga cgctacctct tctgttgacg gtgcttctgg tgctggctcag 60
 ctggttccgg aagttaacgc ttctgaccgg ctggctatgg acccggttgc tggttcttct 120
 accgctgttg ctaccgctgg tcaggttaac ccgatcgacc cgtggatcat caacaacttc 180
 gttcaggctc cgcaggggtga attcaccatc tctccgaaca acaccccggg tgacgttctg 240
 ttcgacctgt ctctgggtcc gcacctgaac ccgttctcgc tgcacctgic tcagatgtac 300
 aacggttggg ttggttaacat gcgtgttctg atcatgctgg ctggtaacgc tttcaccgct 360
 ggtaaaatca tcgtttcttg catcccggcg ggtttcgggt ctcacaacct gaccatcgct 420
 caggctaccc tgttcccgca cgttatcgct gacgttcgta ccctggaccc gatcgaagtt 480
 ccgctggaag acgttcgtaa cgttctggtc cacaacaacg accgtaacca gcagaccatg 540
 cgtctgggtt gcatgctgta caccccgctg cgtaccgggt gtggtaccgg tgactctttc 600
 gttgttgctg gtcgtgttat gacctgccc tctccggact tcaactcct gttcctgggt 660
 ccgccgaccg ttgaacagaa aaccgctccg ttcaccctgc cgaacctgcc gctgtcttct 720
 ctgtctaact ctgctgcicc cgtgccgata tcttctatgg gtatctctcc ggacaacggt 780
 cagtctgttc agttccagaa cggctggtgc accctggacg gtcgtctggt tggtagacc 840
 ccggttctc tgtctcacgt tgctaaaatc cgtggtacct ctaacggtac cgttatcaac 900
 ctgaccgaac tggacggtac cccgttccac ccgttcgaag gtccggctcc gatcggtttc 960
 ccgacctgg gtggtgcca ctggcacatc aacatgacct agttcggta ctcttctcag 1020
 acccagtagc agttgacac caccccggtc acctctgttc cgcacctggg ttctatccag 1080
 gctaacggta tcggttctgg taactacggt ggtgttctgt cttggatctc tccgccgtct 1140
 caccctctg gttctcaggt tgacctgtgg aaaatcccga actacggttc ttctatcacc 1200
 gaagctaccc acctggctcc gtcgttttac ccgccgggt tcggtgaagt tctggttttc 1260
 ttcatgtcta aaatgccggg tccgggtgct tacaacctgc cgtgcctgct gccgcaggaa 1320
 tacatctctc acctggcttc tgaacaggct ccgacctgtg gtgaagctgc tctgctgcac 1380
 tacgttgacc cggacaccgg tcgtaacctg ggtgaattca aagcttacct ggacggtttc 1440
 ctgacctgca ttccgaacgg tgcttcttct ggtccgcagc agctgccgat caacggtggt 1500
 ttctgtttctg tttcttgggt ttctctgttc taccagctga aaccggttgg taccgcttct 1560
 tctgctcgtg gtcgctcggg tctgctcgt tag 1593

<210> 60
 <211> 2250
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN para un gen sintético que codifica una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) optimizada para la expresión en E.coli fusionada en el extremo 5' de un gen que codifica la tAK de Thermotoga maritima.

<400> 60

```

atgatgatgg cttctaaaga cgctacctct tctgttgacg gtgcttctgg tgctggctcag      60
ctggttccgg aagttaacgc ttctgacccg ctggctatgg acccggttgc tggttcttct      120
accgctgttg ctaccgctgg tcaggttaac ccgatcgacc cgtggatcat caacaacttc      180
gttcaggctc cgcaggggtga attcaccatc tctccgaaca acaccccggg tgacgttctg      240
ttcgacctgt ctctgggtcc gcacctgaac ccgttctgct tgcacctgic tcagatgtac      300
aacggttggg ttggttaacat gcgtgttctg atcatgctgg ctggtaacgc tttcaccgct      360
ggtaaaatca tcgtttcttg catcccggcg ggtttcgggt ctcacaacct gaccatcgct      420
caggctaccc tgttcccgca cgttatcgct gacgttctga ccctggacc gatcgaagtt      480
ccgctggaag acgttcgtaa cgttctggtc cacaacaacc accgtaacca gcagaccatg      540
cgtctgggtt gcatgctgta caccccgctg cgtaccgggt gtggtaccgg tgactctttc      600
gttgttgctg gtcgtgttat gacctgcccg tctccggact tcaacttctt gttcctgggt      660
ccgccgaccg ttgaacagaa aaccgctccg ttaccctgct cgaacctgcc gctgtcttct      720
ctgtctaact acgttgctcc cgtgacatc tcttctatgg gtatctctcc ggacaacggt      780
cagtctgttc agttccagaa cggctgttgc accctggacg gtcgtctggt tgggtaccacc      840
ccggttcttc tgtctcacgt tgctaaaatc cgtggtacct ctaacggtac cgttatcaac      900
ctgaccgaac tggacggtac cccgttccac ccgttcgaag gtccggctcc gatcggtttc      960
ccgacctggg gtggttgcca ctggcacatc acatgaccc agttcgggtca ctcttctcag     1020
accagtagcg acgttgacac caccccggac acctctgctc cgcacctggg ttctatccag     1080
gctaacggta tcggttctgg taactacggt ggtgttctgt cttggatctc tccgccgtct     1140
caccctgctg gttctcagggt tgacctgtgg aaaaaccgca actacggttc ttctatcacc     1200
gaagctaccc acctggctcc gctgttttac ccgcccgggt tcggtgaagt tctggttttc     1260
ttcatgtcta aaatgccggg tccgggtgct tacaacctgc cgtgcctgct gccgcaggaa     1320
tacatctctc acctggcttc tgaacaggct ccgaccgttg gtgaagctgc tctgctgcac     1380
tacgttgacc cggacaccgg tcgtaacctg ggtgaattca aagcttaccg ggacggtttc     1440
ctgacctgcg ttccgaacgg tgcttcttct ggtccgcagc agctgccgat caacgggtgt     1500
ttcgttttcg tttcttgggt ttctctgttc taccagctga aaccggttgg taccgcttct     1560
tctgctcggt gtcgtctggg tctgctctgt atgatggcct atctggtttt tcttgggtcca     1620
ccggggggcg gcaaaggtag ctatgcaaaa cgtttacagg aaatcaccgg catcccgcac     1680
attagcacgg gcgacatttt tcgtgatatt gtcaaaaagg aaaaatgacga attaggtaag     1740
aaaataaag aaattatgga gcgcggcgag ttggtgccgg acgaactggt gaatgaagtt     1800
gtcaaacgtc ggctgtctga aaaggattgc gaacgtggct ttattttgga cggttacccc     1860
cgtacagtag ctcaggcaga gtttctcgac ggcttctctga agactcagaa taaggagtta     1920
accgctgceg tctgttctga ggtgcctgaa gaggtggtcg ttcagcgtct gaccgcgcgg     1980
cgtatctgcc cgaagtgtgg tcgtatttac aacctgattt cacttctctc aaaagaagat     2040
gaactgtgtg atgactgcaa agtaaaactg gtgcaacgcg aagatgataa agaggaaact     2100
gtgcgccatc gctacaaagt atatctggaa aaaacccaac cggttatcga ttattatgat     2160
aaaaaaggca ttttgaacg cgttgatggg accatcggca tcgataacgt gattgccgaa     2220
gttctcaaaa tcatggggtg gagtataaaa
    
```

<210> 61

<211> 750

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de una proteína de la cápside de Norovirus (58kDa) fusionada en el extremo N-terminal de la adenilato quinasa de Thermotoga maritima

<400> 61

```

Met Met Met Ala Ser Lys Asp Ala Thr Ser Ser Val Asp Gly Ala Ser
1          5          10          15
Gly Ala Gly Gln Leu Val Pro Glu Val Asn Ala Ser Asp Pro Leu Ala
20          25          30
Met Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly Gln
35          40          45
Val Asn Pro Ile Asp Pro Trp Ile Ile Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro
50          55          60
Gln Gly Glu Phe Thr Ile Ser Pro Asn Asn Thr Pro Gly Asp Val Leu
    
```

ES 2 398 018 T3

65 Phe Asp Leu Ser Leu Gly Pro His Leu Asn Pro Phe Leu Leu His Leu
85 Ser Gln Met Tyr Asn Gly Trp Val Gly Asn Met Arg Val Arg Ile Met
100 Leu Ala Gly Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Ile Val Ser Cys Ile
115 Pro Pro Gly Phe Gly Ser His Asn Leu Thr Ile Ala Gln Ala Thr Leu
130 Phe Pro His Val Ile Ala Asp Val Arg Thr Leu Asp Pro Ile Glu Val
145 Pro Leu Glu Asp Val Arg Asn Val Leu Phe His Asn Asn Asp Arg Asn
165 Gln Gln Thr Met Arg Leu Val Cys Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Thr
180 Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Phe Val Val Ala Gly Arg Val Met Thr
195 Cys Pro Ser Pro Asp Phe Asn Phe Leu Phe Leu Val Pro Pro Thr Val
210 Glu Gln Lys Thr Arg Pro Phe Thr Leu Pro Asn Leu Pro Leu Ser Ser
225 Leu Ser Asn Ser Arg Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ser Met Gly Ile Ser
245 Pro Asp Asn Val Gln Ser Val Gln Phe Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu
260 Asp Gly Arg Leu Val Gly Thr Thr Pro Val Ser Leu Ser His Val Ala
275 Lys Ile Arg Gly Thr Ser Asn Gly Thr Val Ile Asn Leu Thr Glu Leu
290 Asp Gly Thr Pro Phe His Pro Phe Glu Gly Pro Ala Pro Ile Gly Phe
305 Pro Asp Leu Gly Gly Cys Asp Trp His Ile Asn Met Thr Gln Phe Gly
325 His Ser Ser Gln Thr Gln Tyr Asp Val Asp Thr Thr Pro Asp Thr Phe
340 Val Pro His Leu Gly Ser Ile Gln Ala Asn Gly Ile Gly Ser Gly Asn
355 Tyr Val Gly Val Leu Ser Trp Ile Ser Pro Pro Ser His Pro Ser Gly
370 Ser Gln Val Asp Leu Trp Lys Ile Pro Asn Tyr Gly Ser Ser Ile Thr
385 Glu Ala Thr His Leu Ala Pro Ser Val Tyr Pro Pro Gly Phe Gly Glu
405 Val Leu Val Phe Phe Met Ser Lys Met Pro Gly Pro Gly Ala Tyr Asn
420 Leu Pro Cys Leu Leu Pro Gln Glu Tyr Ile Ser His Leu Ala Ser Glu
435 Gln Ala Pro Thr Val Gly Glu Ala Ala Leu Leu His Tyr Val Asp Pro
450 Asp Thr Gly Arg Asn Leu Gly Glu Phe Lys Ala Tyr Pro Asp Gly Phe
465 Leu Thr Cys Val Pro Asn Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Gln Leu Pro
485 Ile Asn Gly Val Phe Val Phe Val Ser Trp Val Ser Arg Phe Tyr Gln
500 Leu Lys Pro Val Gly Thr Ala Ser Ser Ala Arg Gly Arg Leu Gly Leu
515 Arg Arg Met Met Ala Tyr Leu Val Phe Leu Gly Pro Pro Gly Ala Gly
530 Lys Gly Thr Tyr Ala Lys Arg Leu Gln Glu Ile Thr Gly Ile Pro His
545 Ile Ser Thr Gly Asp Ile Phe Arg Asp Ile Val Lys Lys Glu Asn Asp
555 Glu Leu Gly Lys Lys Ile Lys Glu Ile Met Glu Arg Gly Glu Leu Val
575 Pro Asp Glu Leu Val Asn Glu Val Val Lys Arg Arg Leu Ser Glu Lys
595 Asp Cys Glu Arg Gly Phe Ile Leu Asp Gly Tyr Pro Arg Thr Val Ala
610

ES 2 398 018 T3

Gln Ala Glu Phe Leu Asp Gly Phe Leu Lys Thr Gln Asn Lys Glu Leu
 625 Thr Ala Ala Val Leu Phe Glu Val Pro Glu Glu Val Val Val Gln Arg
 645 Leu Thr Ala Arg Arg Ile Cys Pro Lys Cys Gly Arg Ile Tyr Asn Leu
 660 Ile Ser Leu Pro Pro Lys Glu Asp Glu Leu Cys Asp Asp Cys Lys Val
 675 Lys Leu Val Gln Arg Glu Asp Asp Lys Glu Glu Thr Val Arg His Arg
 690 Tyr Lys Val Tyr Leu Glu Lys Thr Gln Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Asp
 705 Lys Lys Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn
 725 Val Ile Ala Glu Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys
 740 745 750

<210> 62
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago MS2

<400> 62

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
 50 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
 85 Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
 100 Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 Ile Tyr
 130

<210> 63
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago PP7

<400> 63

Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr
 1 Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val Gly
 20 Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly
 35 Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp Val
 50 Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg Tyr
 65 Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu
 85 Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Val Gln
 100 Ala Thr Ser Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
 115 120 125

ES 2 398 018 T3

<210> 64
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago PP7

<400> 64

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
 1 5 10 15
 Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
 20 25 30
 Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
 35 40 45
 Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
 50 55 60
 Val Val Asp Ser Gly Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr Gln Val Trp Ser
 65 70 75 80
 His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala Thr Ser Gln Val Glu Asp
 100 105 110
 Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg Tyr Gly Ser Lys Thr Ile
 115 120 125
 Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu Thr Glu Ile Gln Ser
 130 135 140
 Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val Gly Pro Leu Val Gly
 145 150 155 160
 Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn Gly Ala Lys Thr Ala
 165 170 175
 Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp Val Val Asp Ser Gly
 180 185 190
 Leu Pro Lys Val Arg Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile
 195 200 205
 Val Ala Asn Ser Thr Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr
 210 215 220
 Lys Ser Leu Val Ala Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu
 225 230 235 240
 Val Pro Leu Gly Arg
 245

<210> 65
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 65

Met Lys Leu Leu Lys Val Ala Ala Ile Ala Ala Ile Val Phe Ser Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Ala Gly Val Val Pro Gln Tyr Gly Gly Gly Gly Asn His
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Asn Asn Ser Gly Pro Asn Ser Glu Leu Asn Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Tyr Gly Gly Gly Asn Ser Ala Leu Ala Leu Gln Thr Asp Ala Arg
 50 55 60
 Asn Ser Asp Leu Thr Ile Thr Gln His Gly Gly Gly Asn Gly Ala Asp
 65 70 75 80
 Val Gly Gln Gly Ser Asp Asp Ser Ser Ile Asp Leu Thr Gln Arg Gly
 85 90 95
 Phe Gly Asn Ser Ala Thr Leu Asp Gln Trp Asn Gly Lys Asn Ser Glu
 100 105 110
 Met Thr Val Lys Gln Phe Gly Gly Asn Gly Ala Ala Val Asp Gln
 115 120 125
 Thr Ala Ser Asn Ser Ser Val Asn Val Thr Gln Val Gly Phe Gly Asn
 130 135 140
 Asn Ala Thr Ala His Gln Tyr

ES 2 398 018 T3

145

150

<210> 66
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de la proteína AgfA de Salmonella

<400> 66

Met	Lys	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Ile	Val	Val	Ser	Gly
1				5					10					15	
Ser	Ala	Leu	Ala	Gly	Val	Val	Pro	Gln	Trp	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	His
			20					25					30		
Asn	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Gly	Pro	Asp	Ser	Thr	Leu	Ser	Ile	Tyr
		35					40					45			
Gln	Tyr	Gly	Ser	Ala	Asn	Ala	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Ala	Arg
	50				55						60				
Lys	Ser	Glu	Thr	Thr	Ile	Thr	Gln	Ser	Gly	Tyr	Gly	Asn	Gly	Ala	Asp
65					70					75					80
Val	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Asn	Gly
				85					90					95	
Phe	Arg	Asn	Asn	Ala	Thr	Ile	Asp	Gln	Trp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Asp
			100					105					110		
Ile	Thr	Val	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gly	Asn	Asn	Ala	Ala	Leu	Val	Asn	Gln
		115				120						125			
Thr	Ala	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Met	Val	Arg	Gln	Val	Gly	Phe	Gly	Asn
	130					135					140				
Asn	Ala	Thr	Ala	Asn	Gln	Tyr									
145					150										

<210> 67
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de adenilato quinasa de Thermotoga maritime fusionada en el extremo N-terminal a CsgA de E.coli

<400> 67

Met	Met	Ala	Tyr	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Gly	Lys	Gly
1				5					10					15	
Thr	Tyr	Ala	Lys	Arg	Ile	Gln	Glu	Lys	Thr	Gly	Ile	Pro	His	Ile	Ser
			20					25					30		
Thr	Gly	Asp	Ile	Phe	Arg	Asp	Ile	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Asp	Glu	Leu
		35					40					45			
Gly	Lys	Lys	Ile	Lys	Glu	Ile	Met	Glu	Lys	Gly	Glu	Leu	Val	Pro	Asp
	50				55						60				
Glu	Leu	Val	Asn	Glu	Val	Val	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Glu	Lys	Asp	Cys
65					70					75					80
Glu	Lys	Gly	Phe	Ile	Leu	Asp	Gly	Tyr	Pro	Arg	Thr	Val	Ala	Gln	Ala
			85						90					95	
Glu	Phe	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Glu	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln	Leu	Thr	Ala
		115					120						125		
Ala	Val	Leu	Phe	Asp	Val	Pro	Glu	Asp	Val	Val	Val	Gln	Arg	Leu	Thr
			100				105						110		
Ser	Arg	Arg	Ile	Cys	Pro	Lys	Cys	Gly	Arg	Ile	Tyr	Asn	Met	Ile	Ser
	130					135					140				
Leu	Pro	Pro	Lys	Glu	Asp	Glu	Leu	Cys	Asp	Asp	Cys	Lys	Val	Lys	Leu

ES 2 398 018 T3

145 150 155 160
 Val Gl n Arg Asp Asp Asp Lys Gl u Gl u Thr Val Arg Hi s Arg Tyr Lys
 165 170 175
 Val Tyr Leu Gl u Lys Thr Gl n Pro Val Ile Asp Tyr Tyr Gly Lys Lys
 180 185 190
 Gly Ile Leu Lys Arg Val Asp Gly Thr Ile Gly Ile Asp Asn Val Val
 195 200 205
 Ala Gl u Val Leu Lys Ile Ile Gly Trp Ser Asp Lys Gly Ser Gly Val
 210 215 220
 Val Pro Gl n Tyr Gly Gly Gly Gly Asn Hi s Gly Gly Gly Gly Asn Asn
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Asn Ser Gl u Leu Asn Ile Tyr Gl n Tyr Gly Gly Gly Asn
 245 250 255
 Ser Ala Leu Ala Leu Gl n Thr Asp Ala Arg Asn Ser Asp Leu Thr Ile
 260 265 270
 Thr Gl n Hi s Gly Gly Gly Asn Gly Ala Asp Val Gly Gl n Gly Ser Asp
 275 280 285
 Asp Ser Ser Ile Asp Leu Thr Gl n Arg Gly Phe Gly Asn Ser Ala Thr
 290 295 300
 Leu Asp Gl n Trp Asn Gly Lys Asn Ser Gl u Met Thr Val Lys Gl n Phe
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Asn Gly Ala Ala Val Asp Gl n Thr Ala Ser Asn Ser Ser
 325 330 335
 Val Asn Val Thr Gl n Val Gly Phe Gly Asn Asn Ala Thr Ala Hi s Gl n
 340 345 350
 Tyr

<210> 68
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de la proteína hidrofobina 3 de la especie Fusarium

<400> 68

Met Gl n Phe Ser Thr Leu Thr Thr Val Phe Ala Leu Val Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Ala Pro Hi s Gly Ser Ser Gly Gly Asn Asn Pro Val Cys Ser
 20 25 30
 Ala Gl n Asn Asn Gl n Val Cys Cys Asn Gly Leu Leu Ser Cys Ala Val
 35 40 45
 Gl n Val Leu Gly Ser Asn Cys Asn Gly Asn Ala Tyr Cys Cys Asn Thr
 50 55 60
 Gl u Ala Pro Thr Gly Thr Leu Ile Asn Val Ala Leu Leu Asn Cys Val
 65 70 75 80
 Lys Leu Leu

<210> 69
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de la proteína hidrofobina 5 de la especie Fusarium

<400> 69

Met Lys Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Leu Leu Gly Ala Val Val Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Pro Ala Asn Gl u Lys Arg Gl n Ala Tyr Ile Pro Cys Ser Gly
 20 25 30

ES 2 398 018 T3

Leu Tyr Gly Thr Ser Gln Cys Cys Ala Thr Asp Val Leu Gly Val Ala
 35 40 45
 Asp Leu Asp Cys Gly Asn Pro Pro Ser Ser Pro Thr Asp Ala Asp Asn
 50 55 60
 Phe Ser Ala Val Cys Ala Glu Ile Gly Gln Arg Ala Arg Cys Cys Val
 65 70 75 80
 Leu Pro Ile Leu Asp Gln Gly Ile Leu Cys Asn Thr Pro Thr Gly Val
 85 90 95
 Gln Asp

<210> 70
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Balanus albicostatus

<400> 70

Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gln Val
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ser
 20 25 30
 Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu
 35 40 45
 Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser
 50 55 60
 Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr Thr Glu Val
 65 70 75 80
 Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys
 85 90 95
 Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gln Ile Ala Asp Ala Asn
 100 105 110
 Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly
 115 120 125
 Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gln Gly Thr Ala Thr Ser
 130 135 140
 Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Leu Asn Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu
 165 170

<210> 71
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Megabalanus rosa

<400> 71

Met Lys Trp Phe Leu Phe Leu Leu Thr Thr Ala Val Leu Ala Ala Val
 1 5 10 15
 Val Ser Ala His Glu Glu Asp Gly Val Cys Asn Ser Asn Ala Pro Cys
 20 25 30
 Tyr His Cys Asp Ala Asn Gly Glu Asn Cys Ser Cys Asn Cys Glu Leu
 35 40 45
 Phe Asp Cys Glu Ala Lys Lys Pro Asp Gly Ser Tyr Ala His Pro Cys
 50 55 60
 Arg Arg Cys Asp Ala Asn Asn Ile Cys Lys Cys Ser Cys Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Pro Cys Asn Glu Asp His Pro Cys His His Cys His Glu Glu Asp Asp
 85 90 95
 Gly Asp Thr His Cys His Cys Ser Cys Glu His Ser His Asp His His
 100 105 110
 Asp Asp Asp Thr His Gly Glu Cys Thr Lys Lys Ala Pro Cys Trp Arg
 115 120 125
 Cys Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Lys His Asp Val Cys Gly Cys Glu Cys

ES 2 398 018 T3

130 135 140
 Ser Lys Leu Pro Cys Asn Asp Glu His Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Gly
 145 150 155 160
 Gly Val Val Ser Cys Asp Cys Lys Thr Ile Thr Cys Asn Glu Asp His
 165 170 175
 Pro Cys Tyr His Ser Tyr Glu Glu Asp Gly Val Thr Lys Ser Asp Cys
 180 185 190
 Asp Cys Glu His Ser Pro Gly Pro Ser Glu
 195 200

<210> 72

<211> 576

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de fusión de proteína de percebe de *Balanus albicostatus* con la adenilato quinasa de *Thermotoga maritima*; fusión N-terminal

<400> 72

Met Arg Val Leu Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gln
 1 5 10 15
 Leu Ile Glu Met Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu
 20 25 30
 Arg Ile Gly Ile Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu
 35 40 45
 Lys His Val Ile Glu Arg Glu Leu Pro Asp His Glu Ala Leu Lys
 50 55 60
 Leu Ile Leu Asn Thr Leu Val Asp Glu Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp
 65 70 75 80
 Leu Lys Glu Ile Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Glu
 85 90 95
 Arg Phe Lys Glu Ser Val Leu Val Asp Glu Glu Val Leu Lys Ala Ile
 100 105 110
 Glu Glu Val Ser Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met
 115 120 125
 Gly Ile Lys Ala Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala
 130 135 140
 Val Phe Asp Thr Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln Lys Ala Tyr Leu
 145 150 155 160
 Tyr Ala Ile Pro Tyr Glu Tyr Tyr Glu Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr
 165 170 175
 Gly Phe His Gly Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Glu
 180 185 190
 Ile Leu Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile
 195 200 205
 Gly Asn Gly Ala Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp
 210 215 220
 Thr Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Glu Gly Leu Val Met Gly Thr Arg
 225 230 235 240
 Ser Gly Asp Leu Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Ile Ser Pro Gln Glu Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly
 260 265 270
 Val Tyr Gly Leu Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Glu
 275 280 285
 Glu Ala Ala Leu Lys Gly Asp Glu Trp Cys Lys Leu Val Leu Glu Ile
 290 295 300
 Tyr Asp Tyr Arg Ile Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Met
 305 310 315 320
 Asn Gly Val Asp Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ser
 325 330 335
 Pro Ile Thr Arg Glu Asp Val Cys Ser Tyr Leu Glu Phe Leu Gly Val
 340 345 350
 Lys Leu Asp Lys Gln Lys Asn Glu Glu Thr Ile Arg Gly Lys Glu Gly

ES 2 398 018 T3

Ile Ile Ser Thr Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr
 355 370 375 380 385
 Asn Glu Glu Leu Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Glu Ile Val Glu Lys
 390 395 400
 Ile Gly Arg Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu
 405 410 415
 Lys Gl n Val Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly
 420 425 430
 Thr Thr Ser Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr
 435 440 445
 Ser Val Glu Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val
 450 455 460
 Ser Ala Ser Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr
 465 470 475 480
 Thr Glu Val Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr
 485 490 495
 Ala Gly Lys Gly Lys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gl n Ile Ala
 500 505 510
 Asp Ala Asn Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu
 515 520 525
 Thr Asp Gly Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gl n Gly Thr
 530 535 540
 Ala Thr Ser Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val
 545 550 555 560
 Phe Lys Val Leu Asn Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu
 565 570 575

<210> 73

<211> 575

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica de fusión de proteína de percebe de Balanus albicostatus con la adenilato quinasa de Thermotoga maritima; fusión C-terminal

<400> 73

Val Pro Pro Pro Cys Asp Leu Ser Ile Lys Ser Lys Leu Lys Gl n Val
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Ala Gly Asn Ala Ala Val Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ser
 20 25 30
 Gly Ser Gly Val Val Lys Cys Val Val Arg Thr Pro Thr Ser Val Glu
 35 40 45
 Lys Lys Ala Ala Val Gly Asn Thr Gly Leu Ser Ala Val Ser Ala Ser
 50 55 60
 Ala Ala Asn Gly Phe Phe Lys Asn Leu Gly Lys Ala Thr Thr Glu Val
 65 70 75 80
 Lys Thr Thr Lys Asp Gly Thr Lys Val Lys Thr Lys Thr Ala Gly Lys
 85 90 95
 Gly Lys Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ile Gl n Ile Ala Asp Ala Asn
 100 105 110
 Gly Gly Val Ser Glu Lys Ser Leu Lys Leu Asp Leu Leu Thr Asp Gly
 115 120 125
 Leu Lys Phe Val Lys Val Thr Glu Lys Lys Gl n Gly Thr Ala Thr Ser
 130 135 140
 Ser Ser Gly His Lys Ala Ser Gly Val Gly His Ser Val Phe Lys Val
 145 150 155 160
 Leu Glu Ala Glu Thr Glu Leu Glu Leu Lys Gly Leu Met Arg Val Leu
 165 170 175
 Val Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile Lys Tyr Gl n Leu Ile Glu Met
 180 185 190
 Glu Gly Glu Lys Val Leu Cys Lys Gly Ile Ala Glu Arg Ile Gly Ile
 195 200 205
 Glu Gly Ser Arg Leu Val His Arg Val Gly Asp Glu Lys His Val Ile

ES 2 398 018 T3

210
 Gl u Arg Gl u Leu Pro Asp His Gl u Gl u Ala Leu Lys Leu Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Thr Leu Val Asp Gl u Lys Leu Gly Val Ile Lys Asp Leu Lys Gl u Ile
 245 250 255
 Asp Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Gl u Arg Phe Lys Gl u
 260 265 270
 Ser Val Leu Val Asp Gl u Gl u Val Leu Lys Ala Ile Gl u Gl u Val Ser
 275 280 285
 Pro Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Leu Met Gly Ile Lys Ala
 290 295 300
 Ala Met Lys Leu Leu Pro Gly Val Pro Asn Val Ala Val Phe Asp Thr
 305 310 315 320
 Ala Phe His Gln Thr Ile Pro Gln Lys Ala Tyr Leu Tyr Ala Ile Pro
 325 330 335
 Tyr Gl u Tyr Tyr Gl u Lys Tyr Lys Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly
 340 345 350
 Thr Ser His Arg Tyr Val Ser Lys Arg Ala Ala Gl u Ile Leu Gly Lys
 355 360 365
 Lys Leu Gl u Gl u Leu Lys Ile Ile Thr Cys His Ile Gly Asn Gl y Ala
 370 375 380
 Ser Val Ala Ala Val Lys Tyr Gly Lys Cys Val Asp Thr Ser Met Gly
 385 390 395 400
 Phe Thr Pro Leu Gl u Gly Leu Val Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Leu
 405 410 415
 Asp Pro Ala Ile Pro Phe Phe Ile Met Gl u Lys Gl u Gly Ile Ser Pro
 420 425 430
 Gln Gl u Met Tyr Asp Ile Leu Asn Lys Lys Ser Gly Val Tyr Gly Leu
 435 440 445
 Ser Lys Gly Phe Ser Ser Asp Met Arg Asp Ile Gl u Gl u Ala Ala Leu
 450 455 460
 Lys Gly Asp Gl u Trp Cys Lys Leu Val Leu Gl u Ile Tyr Asp Tyr Arg
 465 470 475 480
 Ile Ala Lys Tyr Ile Gly Ala Tyr Ala Ala Ala Met Asn Gly Val Asp
 485 490 495
 Ala Ile Val Phe Thr Ala Gly Val Gly Gl u Asn Ser Pro Ile Thr Arg
 500 505 510
 Gl u Asp Val Cys Ser Tyr Leu Gl u Phe Leu Gly Val Lys Leu Asp Lys
 515 520 525
 Gln Lys Asn Gl u Gl u Thr Ile Arg Gly Lys Gl u Gly Ile Ile Ser Thr
 530 535 540
 Pro Asp Ser Arg Val Lys Val Leu Val Val Pro Thr Asn Gl u Gl u Leu
 545 550 555 560
 Met Ile Ala Arg Asp Thr Lys Gl u Ile Val Gl u Lys Ile Gly Arg
 565 570 575

<210> 74

<211> 125

<212> PRT

<213> Balanus albicostatus

<400> 74

Met Lys Tyr Thr Leu Ala Leu Leu Phe Leu Thr Ala Ile Ile Ala Thr
 1 5 10 15
 Phe Val Ala Ala His Lys His His Asp His Gly Lys Ser Cys Ser Lys
 20 25 30
 Ser His Pro Cys Tyr His Cys His Thr Asp Cys Gl u Cys Asn His His
 35 40 45
 His Asp Asp Cys Asn Arg Ser His Arg Cys Trp His Lys Val His Gly
 50 55 60
 Val Val Ser Gly Asn Cys Asn Cys Asn Leu Leu Thr Pro Cys Asn Gln
 65 70 75 80
 Lys His Pro Cys Trp Arg Arg His Gly Lys Lys His Gly Leu His Arg
 85 90 95
 Lys Phe His Gly Asn Ala Cys Asn Cys Asp Arg Leu Val Cys Asn Ala
 100 105 110
 Lys His Pro Cys Trp His Lys His Cys Asp Cys Phe Cys

ES 2 398 018 T3

115

120

125

<210> 75
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe

<400> 75

Ser Lys Leu Pro Cys Asn Asp Glu His Pro Cys Tyr Arg Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Val Val Ser Cys Asp Cys Lys
 20

<210> 76
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe

<400> 76

Ser Lys Leu Pro Ser Asn Asp Glu His Pro Ser Tyr Arg Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Val Val Ser Ser Asp Ser Lys
 20

<210> 77
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia proteica de un péptido derivado de una proteína de cemento de percebe

<400> 77

Lys Thr Ile Thr Cys Asn Glu Asp His Pro Cys Tyr His Ser Tyr Glu
 1 5 10 15
 Glu Asp Gly Val Thr Lys Ser Asp Cys Asp Cys Glu
 20 25

REIVINDICACIONES

1. Método de validación de un proceso de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, que comprende las etapas de:
- 5
- (a) obtener una muestra que contiene o es sospechosa de contener un contaminante;
 - (b) someter la muestra a un proceso de tratamiento en presencia de una cantidad definida de un indicador de proceso biológico que comprende una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico;
 - (c) medir la actividad residual de quinasa y opcionalmente calcular la reducción en la actividad de quinasa; y
- 10 (d) comparar dicha actividad residual de quinasa con una actividad de quinasa predeterminada, o comparar dicha reducción en la actividad de quinasa con una reducción predeterminada en la actividad de quinasa, donde la actividad predeterminada de quinasa o la reducción predeterminada en la actividad de quinasa corresponde a una reducción confirmada en la cantidad o actividad del contaminante bajo las mismas condiciones.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que la reducción predeterminada en la actividad de quinasa es por lo menos una reducción de 3 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 6 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 7 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 8 veces logarítmicas.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la reducción confirmada en la cantidad o actividad del
- 20 contaminante es por lo menos una reducción de 3 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 6 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 7 veces logarítmicas, o por lo menos una reducción de 8 veces logarítmicas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende medir la actividad de quinasa antes de
- 25 tratar la muestra y después de tratar la muestra.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende tratar la muestra a 80°C durante por lo menos 10 minutos antes de medir la actividad residual de la quinasa.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la medición de la actividad residual de la quinasa comprende añadir un sustrato que comprende ADP a la quinasa residual y medir la formación de ATP.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende continuar el tratamiento hasta que la actividad residual de quinasa o la reducción en la actividad de quinasa corresponda a una reducción confirmada en
- 35 la cantidad o actividad del contaminante de por lo menos 3 veces logarítmicas, o por lo menos 6 veces logarítmicas, o por lo menos 7 veces logarítmicas, o por lo menos 8 veces logarítmicas.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de registrar los datos obtenidos en la etapa (c) en un portador de datos adecuado.
- 40
9. Utilización de una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico como un indicador de procesos biológicos para validar un proceso de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra.
- 45 10. Indicador de proceso biológico para validar un proceso de tratamiento en el que se reduce la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, en el que el indicador comprende una quinasa termoestable unida covalentemente a un componente biológico, y en el que el componente biológico no es un anticuerpo, y en el que el componente biológico se selecciona del grupo que consiste en: una proteína de la sangre; una proteína fúngica seleccionada del grupo que consiste en proteínas de hidrofobinas, proteínas de esporas fúngicas, proteínas hifales, micotoxinas y priones fúngicos; una proteína de autoagregación seleccionada del grupo que consiste en priones, proteínas miméticas de priones, fibrilas amiloides, proteína beta amiloide, proteína tau, proteína de unión a poliadenina, proteína C de surfactante de pulmón, hidrofobinas, chaplinas, rodlinas, proteínas de cubiertas de esporas gram positivas, y proteínas de tipo cemento de percebe; una proteína fimbrial bacteriana; una proteína de toxina bacteriana; una proteína de espora bacteriana; un ácido nucleico; un lípido; y un carbohidrato.
- 50
11. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 10, en el que dicha proteína de sangre se selecciona del grupo que consiste en proteínas de coagulación de la sangre, proteínas del suero, proteínas de plaquetas, glicoproteínas de células sanguíneas y hemoglobina, preferiblemente en el que dicha proteína de coagulación de la sangre se selecciona del grupo que consiste en fibrina, fibrinógeno y sustratos de transglutaminasa.
- 60

12. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 10, en el que el ácido nucleico se selecciona entre una molécula de ADN o una molécula de ARN.
13. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 10, en el que el carbohidrato se selecciona del grupo que
5 consiste en exopolisacárido, lipopolisacárido, peptidoglicano, quitina, glucano, lignina, mucina, glicolípidos, glicoproteínas, extractos de esporas, polisacáridos de cápsulas de levadura, y secreciones de invertebrados.
14. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 10, en el que el lípido se selecciona del grupo que
10 consiste en glicolípidos y gangliósidos.
15. Indicador de proceso biológico según las reivindicaciones 10-13, en el que el indicador es parte de una matriz biológica, preferiblemente en el que la matriz biológica es un mimético de la muestra.
16. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 15, en el que la matriz biológica comprende uno o más
15 componentes seleccionados del grupo que consiste en sangre, suero, albúmina, moco, óvulo, tejido neurológico, alimento, material de animal sacrificado y una muestra de contaminante de análisis disponible comercialmente.
17. Indicador de proceso biológico según las reivindicaciones 10-16, en el que la quinasa termoestable es adenilato quinasa, acetato quinasa o piruvato quinasa.
20
18. Indicador de proceso biológico según las reivindicaciones 10-17, en el que el indicador comprende además un agente para estabilizar la quinasa, preferiblemente el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en iones metálicos, azúcares, alcoholes de azúcares y agentes formadores de geles.
- 25 19. Indicador de proceso biológico según las reivindicaciones 10-18, en el que el componente biológico y la quinasa están unidas juntas en forma de una proteína de fusión.
20. Indicador de proceso biológico según las reivindicaciones 10-19, en el que el indicador de proceso biológico está inmovilizado en o sobre un soporte sólido, preferiblemente en el que el indicador de proceso biológico está
30 inmovilizado en o sobre el soporte sólido mediante reticulación o adsorción química.
21. Indicador de proceso biológico según la reivindicación 20, en el que el soporte sólido es una tira indicadora, una tira reactiva o una microesfera.
- 35 22. Kit para utilizar en la validación de un proceso de tratamiento en el que se reduce la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra, que comprende:
- (a) un indicador de proceso biológico según cualquiera de las reivindicaciones 10-21, y
(b) un sustrato para la quinasa termoestable, preferiblemente en el que el sustrato para la quinasa termoestable es
40 ADP.
23. Kit según la reivindicación 18, que comprende además luciferina/luciferasa; y/o que comprende además una tabla de búsqueda que correlaciona la actividad de quinasa del indicador con la cantidad o actividad del
45 contaminante.
24. Método según la reivindicación 1, en el que el indicador de proceso biológico en la etapa (B) es un indicador de proceso biológico según cualquiera de las reivindicaciones 10-21, o la utilización de un indicador biológico según cualquiera de las reivindicaciones 10-21, para validar un proceso de tratamiento para reducir la cantidad o actividad de un contaminante en una muestra.
50

Figura 1

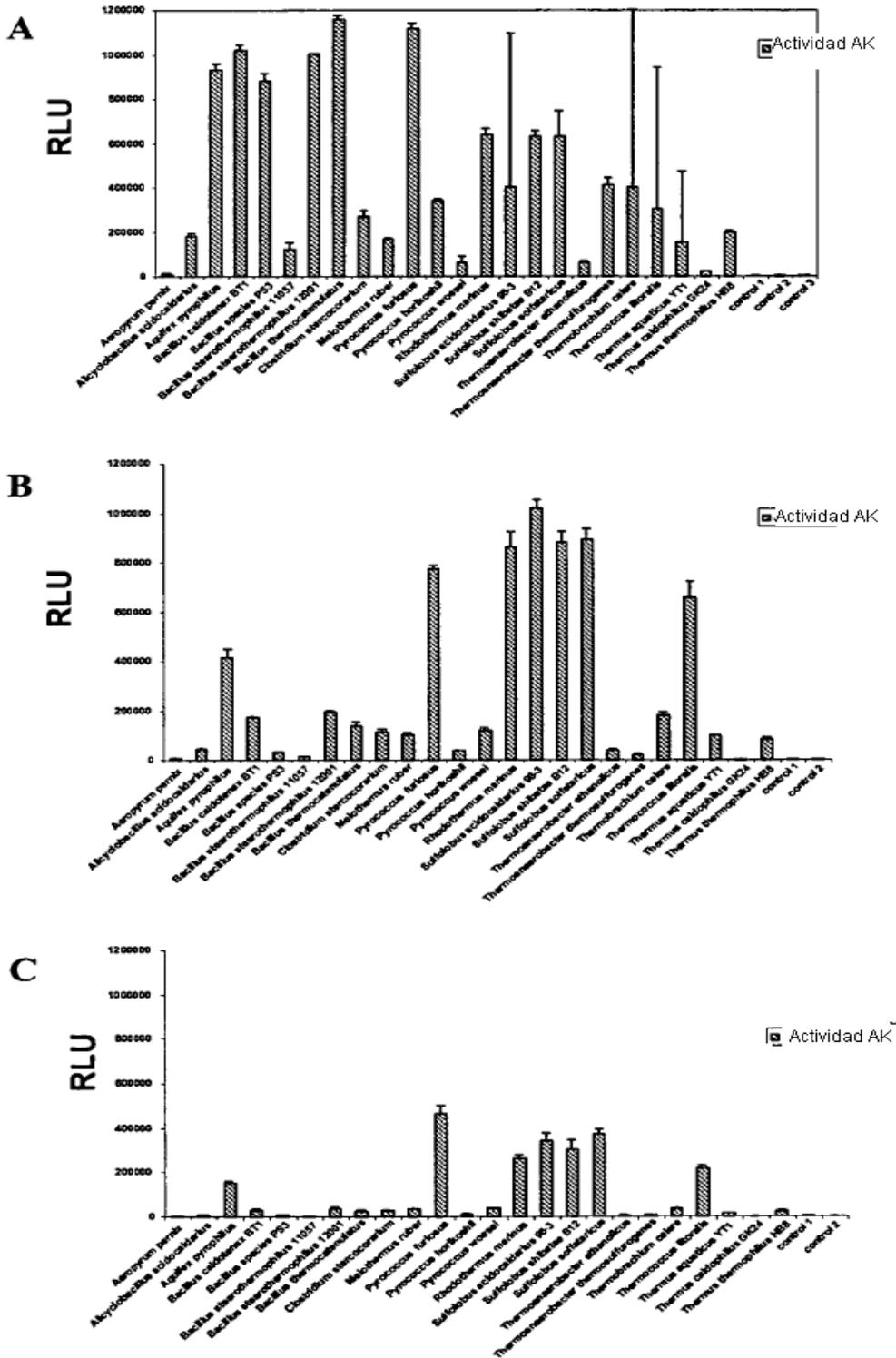


Figura 2

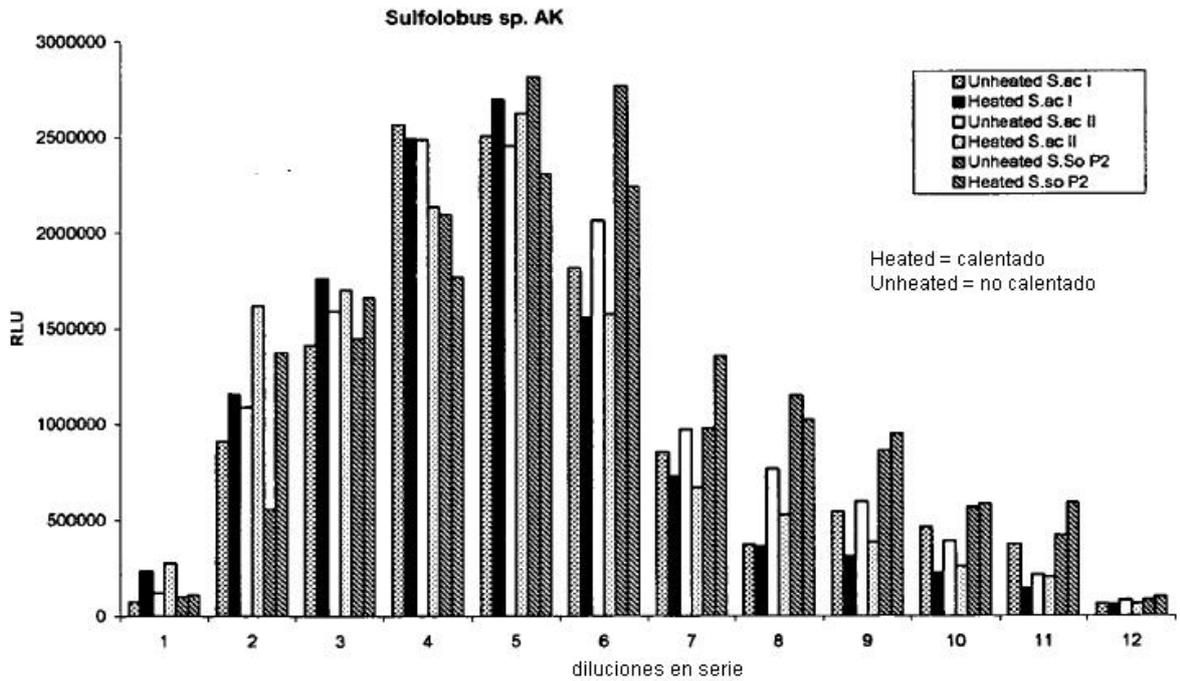
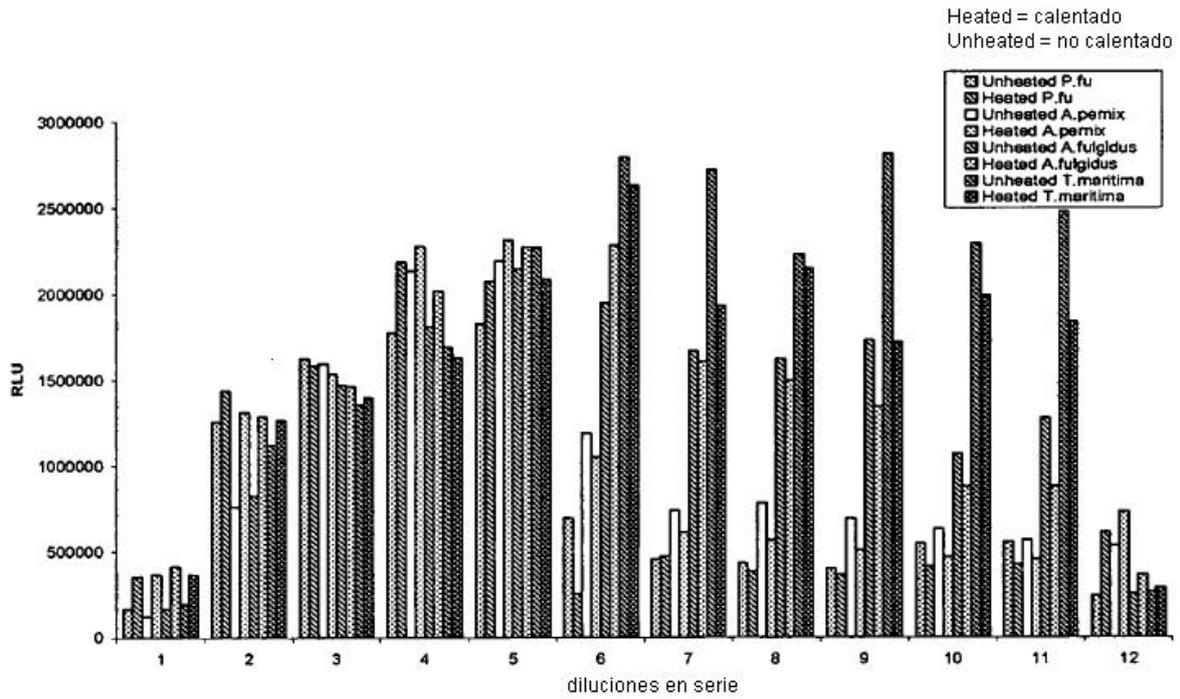


Figura 3

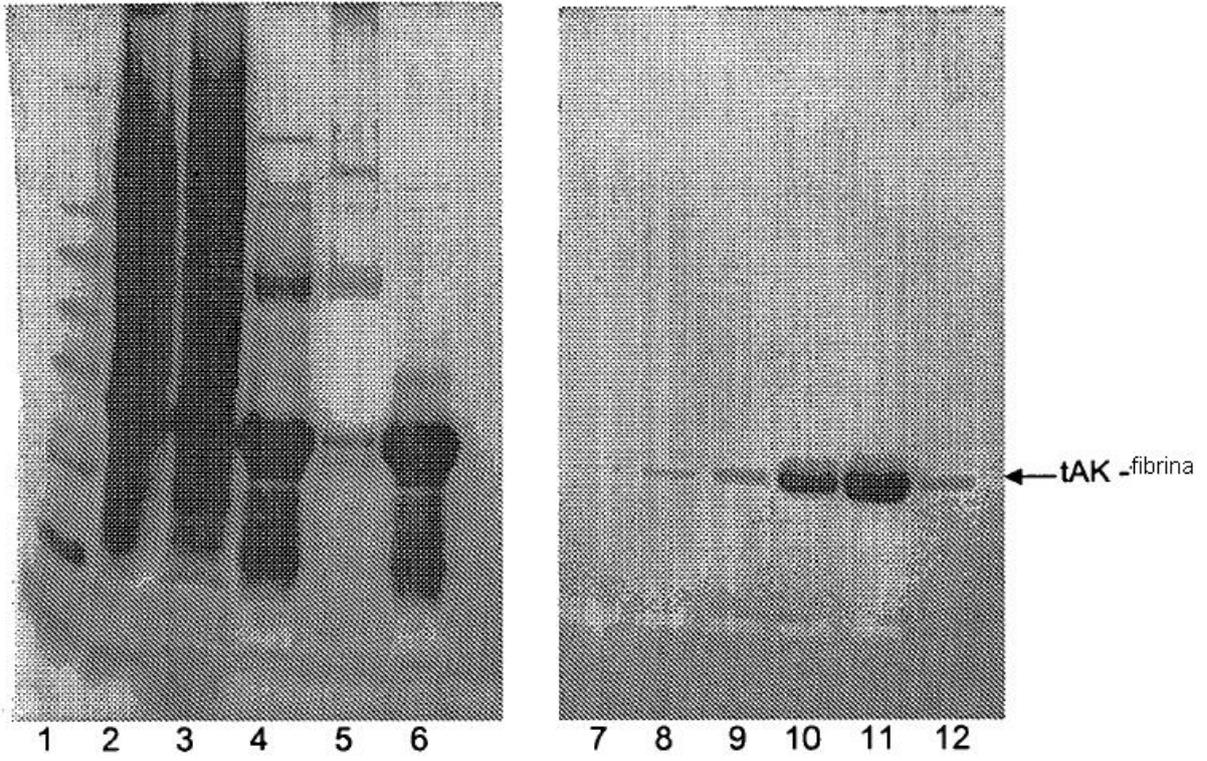


Figura 4

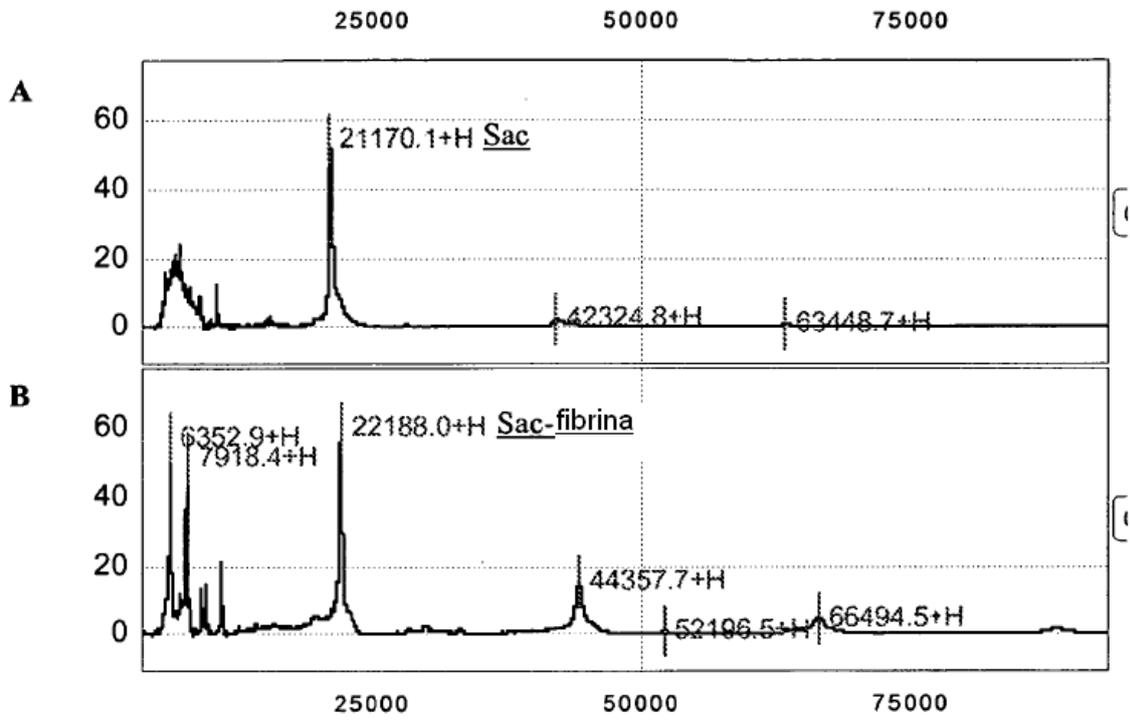


Figura 5

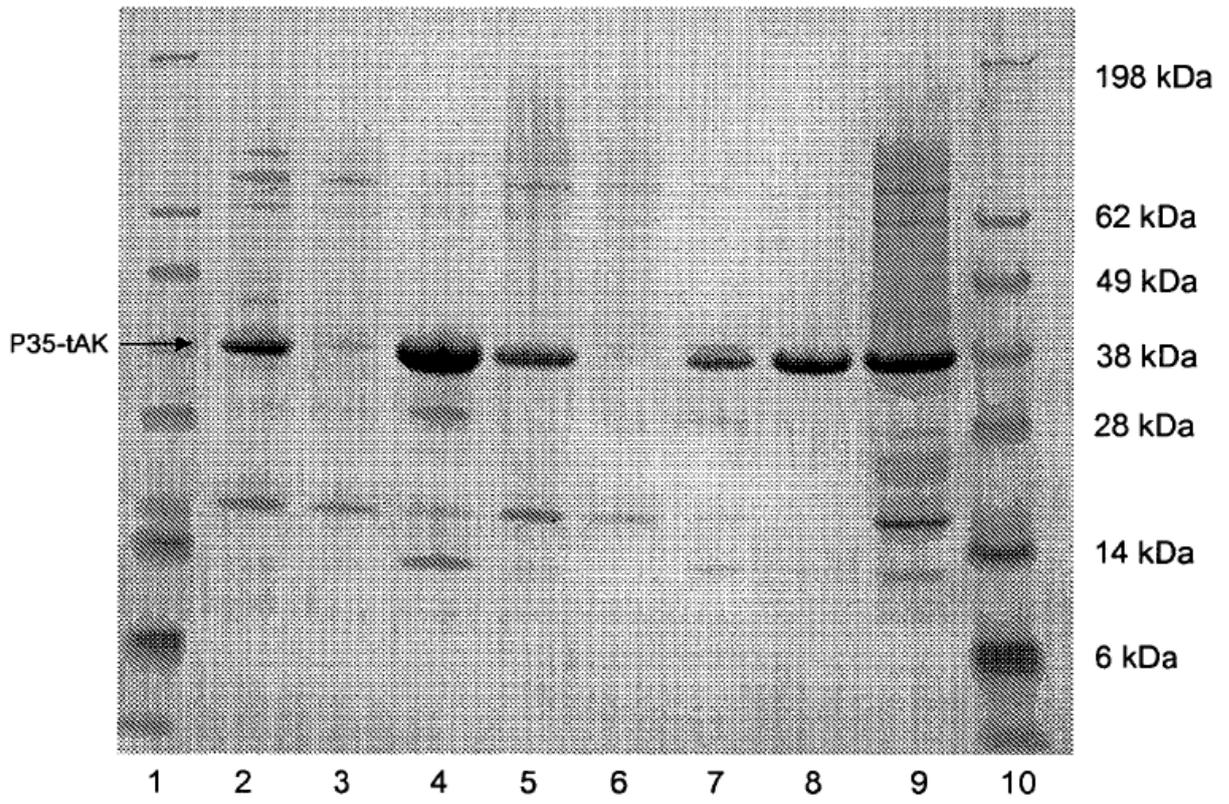


Figura 6

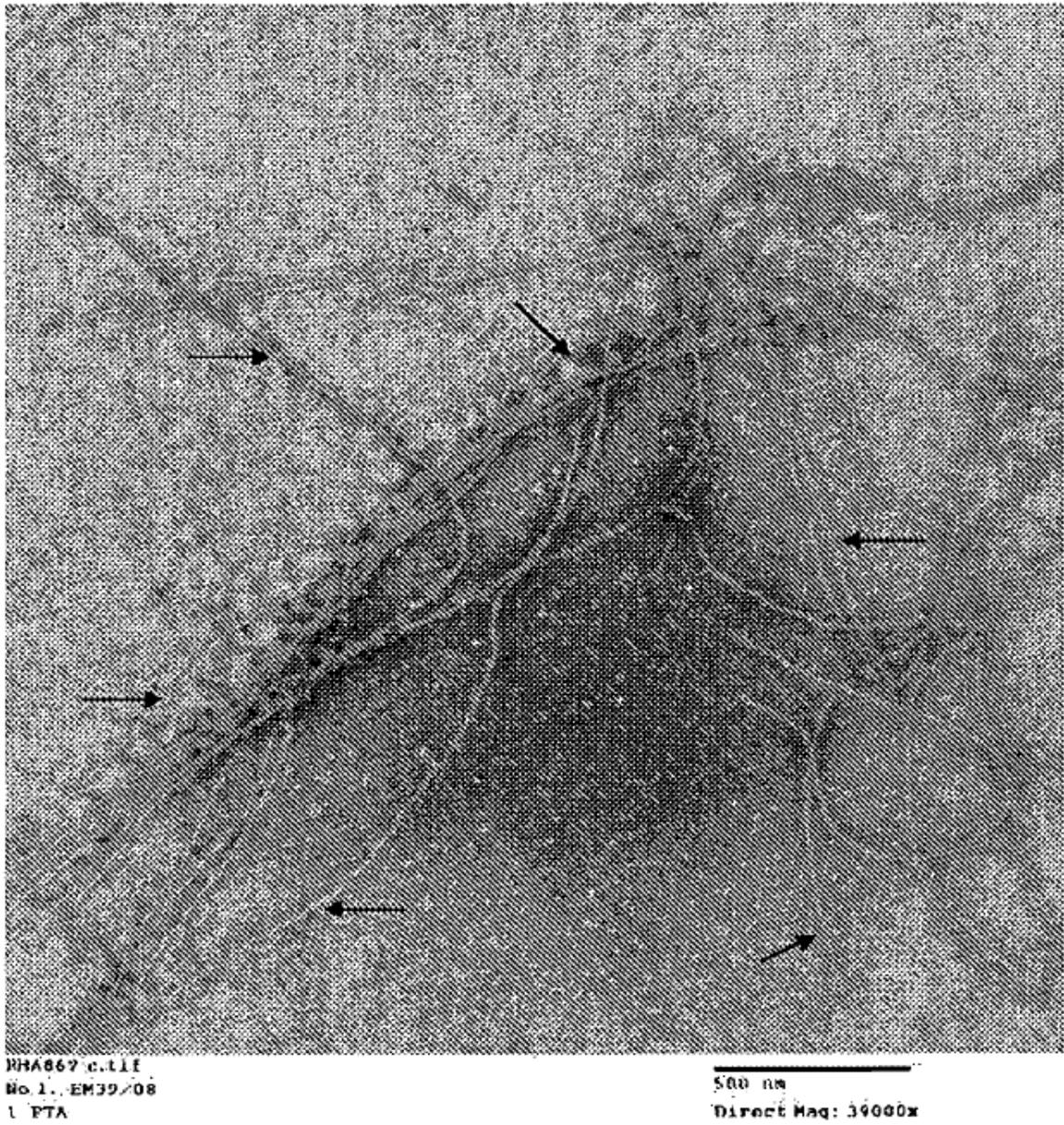


Figura 7

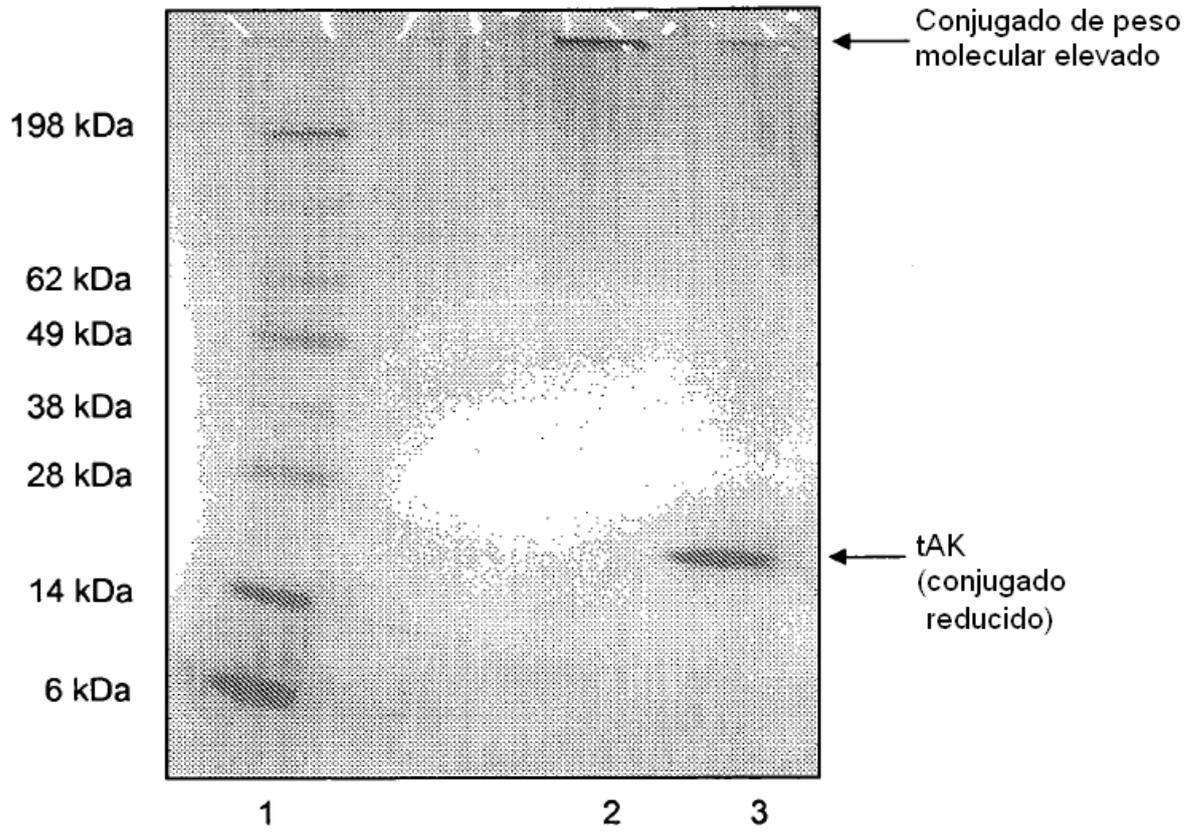


Figura 8

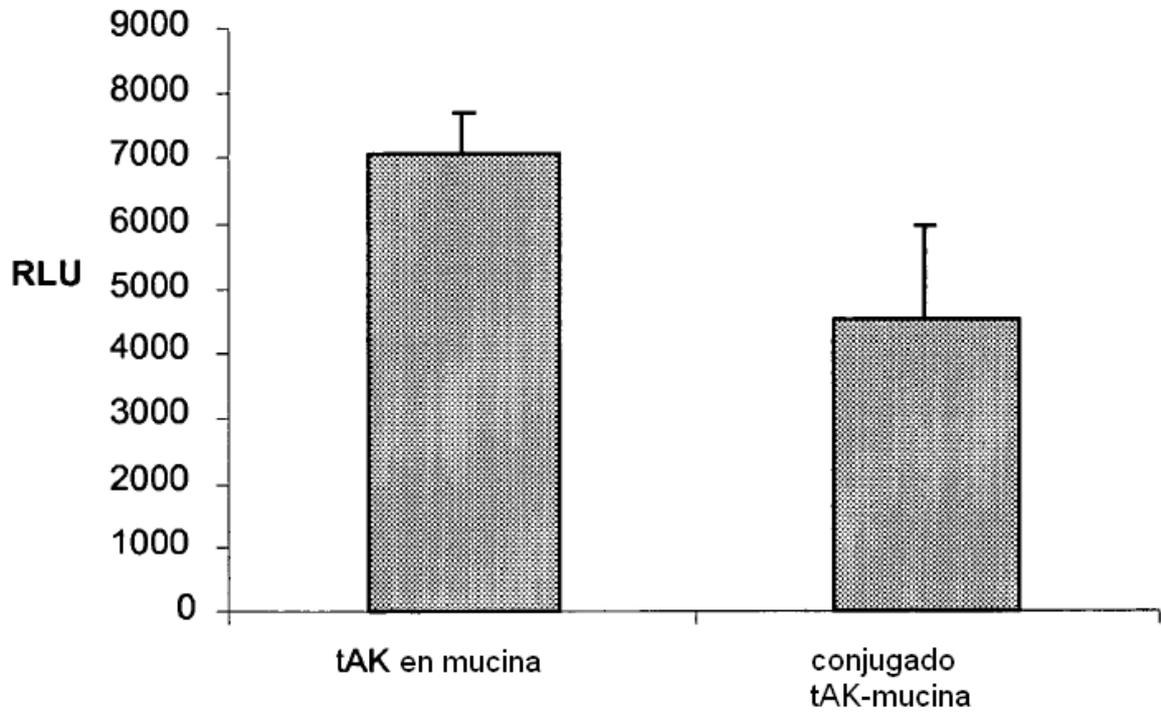


Figura 9

